

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Асцит как микроокружение
опухоли при раке яичников:
взаимосвязь с прогнозом
и химиорезистентностью*

*Перспективы таргетной
терапии глиом низкой степени
злокачественности у детей*

*Сравнение молекулярно-
генетических методов
выявления мутаций в гене CALR
при миелопролиферативных
заболеваниях*

ТОМ 6 № 2
2019



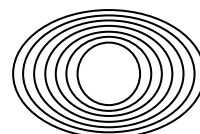
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук.

Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ь Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й Ж У Р Н А Л

Целевая читательская аудитория: онкологи, молекулярные биологи, генетики, биохимики, вирусологи, онкоэпидемиологи, химиотерапевты.

Контент: обзоры, мини-обзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, комментарии ведущих специалистов.

Члены редакционной коллегии и авторы журнала – ведущие российские и зарубежные онкологи, молекулярные биологи, генетики, химиотерапевты и специалисты смежных специальностей.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

2 ^{ТОМ 6}
'19

Учредители:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Прием статей: онлайн на сайте
<http://umo.abvpress.ru/jour>
или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор М.А. Андросова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
И.В. Гапонова, +7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

*в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 г.)*

**При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.**
**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых рекламных
материалов.**
**В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2019. Том 6. № 2. 1–60

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Бойчук Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Глушанкова Наталия Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Животовский Борис Давидович, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпухин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышковска Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия)

Юрисич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Заридзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

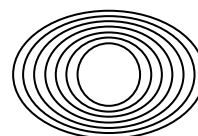
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER
OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

Target audience: oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, cancer epidemiologists, chemotherapists.

Information content: reviews, mini-reviews, brief communications and full-size research articles, comments of leading experts.

Editorial board members and authors of the journal are the leading Russian and foreign oncologists, molecular biologists, geneticists, chemotherapists and specialists of related professions.

FOUNDED IN 2014

2^{Vol. 6}
'19

Founders: N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader M.A. Androsova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager I.V. Gaponova,
+7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

*The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information*

*Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560
dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi
molekulyarnoy onkologii".**

**The editorial board is not responsible
for advertising content.**

**The authors, point of view given
in the articles may not coincide with
the opinion of the editorial board.**

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2019. Vol. 6
No. 2. 1—60

© PH "ABV-Press", 2019

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., DSc, PhD, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Yakubovskaya Marianna G., MD, PhD, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova Margarita V., PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Berstein Lev M., MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Bozhenko Vladimir K., MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Boychuk Sergey V., MD, PhD, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

Gloushankova Natalia A., DSc, PhD, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Gudkov Andrey V., DSc, PhD, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)

Zhivotovskiy Boris D., DSc, PhD, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)

Imyanitov Eugeny N., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Kazansky Dmitry B., DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Karpukhin Aleksander V., DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)

Kzhyshkovska Juliya G., DSc, PhD, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)

Lazarevich Natalia L., DSc, PhD, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Mazurenko Natalia N., DSc, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Mirkin Sergey M., Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)

Sergeeva Natalia S., DSc, PhD, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Stepanova Evgenia V., MD, PhD, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)

Tchevkina Elena M., DSc, PhD, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Tcherdyntseva Nadezhda V., DSc, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)

Jurisc Vladimir, Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)

EDITORIAL COUNCIL

Belitsky Gennady A., MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Gurtsevitch Vladimir E., MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Davydov Mikhail I., MD, PhD, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Zaridze David G., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Kopnin Boris P., DSc, PhD, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kubasova Irina Yu., PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kushlinskii Nikolay E., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Lichtenstein Anatoly V., DSc, PhD, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Tjulandin Sergey A., MD, PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),
- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour> или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

А.Б. Виллерт, Л.А. Коломиец, Н.В. Юнусова

Асцит как микроокружение опухоли при раке яичников: взаимосвязь прогноза и химиорезистентности 8

А.В. Семьянихина, А.О. Расулов, Л.Н. Любченко

Клинико-генетические аспекты дифференциальной диагностики наследственного неопластического колоректального рака 21

Э.Ф. Валиахметова, Л.А. Ясько, Л.И. Папуша, А.Е. Друй, А.И. Карачунский

Перспективы таргетной терапии глиом низкой степени злокачественности у детей 28

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В.В. Цепенко, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, Г.О. Рухадзе, В.Ю. Скоропад

Асинхронная репликация генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и больных с полинеоплазиями 42

Л.А. Кесаева, А.Ю. Буланов, Ю.П. Финашутина, В.В. Тихонова, О.Н. Солопова, Е.Н. Мисюрина, Н.Н. Касаткина, Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин, А.А. Турба, А.А. Солодовник, И.Н. Солдатова, А.В. Мисюрин

Сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* при миелопролиферативных заболеваниях 48

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

Прогностическая значимость экспрессии гена *BRCA1* у больных раком молочной железы 55

REVIEWS

A.B. Villert, L.A. Kolomiets, N.V. Yunusova

**Ascitis as a unique microenvironment of tumors in ovarian cancer:
interaction with prognosis and chemoresistance 8**

A.V. Semyanikhina, A.O. Rasulov, L.N. Lyubchenko

Clinical and genetic aspects of differential diagnostics of hereditary non-polyposis colorectal cancer 21

E.F. Valiakhmetova, L.A. Yasko, L.I. Papusha, A.E. Druy, A.I. Karachunsky

Promises of targeted therapy for low grade gliomas in children. 28

EXPERIMENTAL REPORTS

V.V. Tsepenko, G.F. Mikhailova, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub, G.O. Rukhadze, V.Yu. Skoropad

**Asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes in gastric cancer patients
and patients with multiple tumors 42**

*L.A. Kesaeva, A.Yu. Bulanov, Yu.P. Finashutina, V.V. Tikhonova, O.N. Solopova,
E.N. Misyurina, N.N. Kasatkina, N.A. Lyzhko, V.A. Misyurin, A.A. Turba,
A.A. Solodovnik, I.N. Soldatova, A.V. Misyurin*

**Comparison of molecular genetic methods of detection of mutations
in the *CALR* gene in myeloproliferative disorders 48**

*M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, E.Yu. Garbukov,
E.M. Slonimskaya, N.V. Litviakov*

The prognostic significance of *BRCA1* gene expression in patients with breast cancer 55

Асцит как микроокружение опухоли при раке яичников: взаимосвязь прогноза и химиорезистентности

А.Б. Виллерт¹, Л.А. Коломиец^{1,2}, Н.В. Юнусова^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»; Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Алиса Борисовна Виллерт avillert@yandex.ru

Выраженная гетерогенность карцином яичника на молекулярно-генетическом уровне сопряжена с отсутствием специфических маркеров химиорезистентности. При этом асцит является привлекательной биологической жидкостью для обнаружения биомаркеров, поскольку она легкодоступна для получения. Данный обзор посвящен последним достижениям в изучении особенностей компонентов асцитической жидкости в аспекте их взаимосвязи с химиорезистентностью. Представлены собственные данные, касающиеся содержания параметров системы IFR (свободных IGFs, а также IGFBP-3, IGFBP-4 и PAPP-A) в асцитической жидкости и опухолевой ткани при диссеминированном раке яичников, которые свидетельствуют о значимости их изучения. Показано, что уровень белков системы IGF существенно зависит от объема асцитической жидкости. Изучение особенностей асцитической жидкости при раке яичников напрямую связано с перспективой появления новых возможностей для терапии диссеминированного рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников, асцит, прогноз, химиорезистентность

Для цитирования: Виллерт А.Б., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В. Асцит как микроокружение опухоли при раке яичников: взаимосвязь прогноза и химиорезистентности. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(2):8–20.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-8-20

Ascitis as a unique microenvironment of tumors in ovarian cancer: interaction with prognosis and chemoresistance

A.B. Villert¹, L.A. Kolomiets^{1,2}, N.V. Yunusova^{1,2}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia

The severe heterogeneity of ovarian carcinomas on the molecular genetic level is associated with the absence of specific markers of chemoresistance. At the same time, ascites is an attractive biomarker detection fluid because it is easily obtained. The review is dedicated to the latest advances in the study of components characteristics of ascitic fluid in terms of their relationship with chemoresistance. Own data are submitted regarding the contents of the IFR system parameters (free IGFs, as well as IGFBP-3, IGFBP-4 and PAPP-A) in ascitic fluids and tumor tissue in disseminated ovarian cancer, which show the importance of their study. It is shown that the proteins level of the IGF system substantially depend on the volume of ascitic fluid. Studying the features of ascitic fluid in ovarian cancer is directly related to the prospect of new opportunities for disseminated ovarian cancer treatment.

Key words: ovarian cancer, ascites, prognosis, chemoresistance

For citation: Villert A.B., Kolomiets L.A., Yunusova N.V. Ascitis as a unique microenvironment of tumors in ovarian cancer: interaction with prognosis and chemoresistance. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):8–20.

Рак яичников (РЯ) представляет собой чрезвычайно гетерогенное заболевание. На сегодняшний день не существует абсолютных признаков чувствительности и резистентности опухоли к лекарственным препаратам. Отсутствие очевидных мишеней в терапии РЯ продиктовано дефицитом четких представлений о патогенезе данного заболевания. Поиск маркеров прогнозирования течения и эффективности лечения активно продолжается и сопряжен с исследованием не только опухолевой ткани, но и асцитической жидкости.

Асцит и его компоненты как предмет исследований при раке яичников

Асцит представляет собой уникальное микроокружение опухоли, обеспечивающее физический субстрат для накопления клеточного и бесклеточного компонентов. Стандартным методом изучения клеточного компонента асцитической жидкости является цитологическое исследование, направленное на выявление атипичных клеток. Более глубокое изучение клеточного состава асцита доступно при применении

проточной цитометрии, иммунофлуоресценции и т. д. Существующий в настоящее время вопрос, касающийся идентичности молекулярно-генетических характеристик свободно флотирующих в асцитической жидкости опухолевых клеток и клеток, представляющих массив опухоли, остается пока открытым, хотя нельзя не принимать во внимание, что фенотипически эти клетки неодинаковы, а согласно представлениям клональной эволюции должны отражать разные этапы опухолевой прогрессии с высокой вероятностью различий не только в уровнях экспрессии молекул клеточной адгезии, таких как Е-кадгерин [1]. Популяции клеток выполняют определенные функции и связаны друг с другом системой сигналов с помощью «внутренних» растворимых факторов (бесклеточный компонент асцита) [2].

Бесклеточный компонент асцита обеспечивает связь клеточного компонента посредством растворимых факторов (ростовые факторы, цитокины, белки, метаболиты), а также внеклеточных везикул [3].

Цитокиновый профиль асцита при РЯ демонстрирует присутствие как проонкогенных факторов, так и антионкогенных [4–7]. Показано значительное увеличение проонкогенных цитокинов IL-6, -8, -10, -15, IP-10, MCP-1, MIP-1b и VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста) при значимом снижении уровней IL-2, -5, -7, -17, PDGF-BB (тромбоцитарный фактор роста BB) и RANTES (цитокин A5, хемокин, выделяемый Т-клетками при активации). Эти факторы в совокупности способствуют созданию провоспалительного и иммуносупрессивного микроокружения опухоли [7]. Среди них IL-6 и -10 привлекают наибольшее внимание из-за их корреляции с плохими прогнозом и ответом на терапию [5, 8]. Также показано, что IL-6 является независимым прогностическим фактором худшего исхода при РЯ [5].

Целью исследования D. Lane и соавт. была оценка 6 факторов воспаления в асцитической жидкости: IL-6, -10, остеопротегерин, лептин, suPAR (растворимая форма рецептора урокиназного плазминогена) и CCL-18 (СС-хемокина) в качестве диагностических биомаркеров для предсказания лекарственной устойчивости у 52 пациенток с диссеминированным серозным РЯ. Установлена взаимосвязь диссеминации процесса и IL-6, который может быть использован в комбинации с сывороточным CA125 для дифференциальной диагностики доброкачественного и злокачественного процессов, а комбинация сывороточного CA125 и лептина в асците может служить предиктором резистентности к терапии 1-й линии [8].

Ретроспективный анализ цитокинового и хемокинового профилей асцита у больных диссеминированным РЯ на этапе первичной циторедукции проведен во взаимосвязи с безрецидивной и общей выживаемостью. Показано, что сочетание высоких уровней TNF- α (фактора некроза опухоли α) и IL-6 в асците при первичной хирургии предсказывает худшую без-

рецидивную выживаемость, что позволило авторам рассматривать TNF- α и IL-6 в асците в качестве маркеров рецидива заболевания [9].

Изучение ряда цитокинов, протеинов и ростовых факторов (IL-6, -8, dickkopf-1 (растворимого белка, ингибитора сигнального пути WNT), GDF-15 (ростового фактора дифференцировки 15), TRAIL 10 (фактора некроза опухоли 10), OPG (остеопротегерина), остеопонтин, остеоонектин, HE4 (человеческого эпидидимального секреторного белка 4), SCF (фактора роста стволовых клеток)) проведено во взаимосвязи с клинической стадией, фактом наличия опухолевых клеток в асцитической жидкости [10]. Стадия была ассоциирована только с фактором стволовых клеток и остеопротегерином: более низкий уровень фактора стволовых клеток и более высокий уровень остеопротегерина наблюдали при диссеминированном РЯ по сравнению с локализованными формами. Значительное снижение уровня фактора стволовых клеток и увеличение остеопротегерина и IL-6 наблюдалось при положительной перитонеальной цитологии. Перитонеальная диссеминация также была взаимосвязана с более высокими уровнями TRAIL 10, остеоонектина и IL-6 [10].

Химический состав, или метаболический профиль асцитической жидкости, косвенно отражает биохимические процессы, происходящие на брюшине и органах брюшной полости, однако до настоящего момента остается недостаточно изученным. В целом метаболическое перепрограммирование не входило в круг интересов онкологических исследований до начала 1990-х годов. Более того, в онкологии отказывались признавать изменения метаболизма как признак рака. Лишь в 2011 г. этот фактор был утвержден в качестве отличительной особенности злокачественно трансформированных клеток.

Результаты исследования метаболического профиля при асцитах разной этиологии отражают характер особенностей, лежащих в основе вызвавших и поддерживающих их процессов.

Изучение состава метаболитов в асците продемонстрировало, что наиболее важные различия состава при эпителиальных карциномах яичника и портальном циррозе касаются концентрации жирных кислот, холестерина, церамидов, глицерол-3-фосфата и глюкозы. Было обнаружено, что 2-гидроксиизовалерат присутствует в наименьших концентрациях при РЯ, тогда как глюкозо-1-фосфат является доминирующим метаболитом в злокачественном асците. В настоящее время неизвестна причина истощения 2-гидроксиизовалерата в асците при РЯ. При этом ясно, что распад аминокислот с разветвленной цепью приводит к продукции 2-гидроксиизовалерата в организме [11], его концентрация указывает на увеличение катаболизма аминокислот, и его уровень повышается в моче у пациентов с лакто- и кетоацидозом [12]. Второй метаболит, глюкозо-1-фосфат, является продуктом анаэробного

распада углеводов, и повышение его уровня указывает на увеличение использования глюкозы микроокружением асцитной опухоли [12]. Однако для подтверждения факта изменения метаболизма клеток карциномы необходимы данные по измерению параметров поглощения глюкозы и уровню конечного продукта анаэробного гликолиза — лактата — в опухоли и микроокружении асцитной опухоли. Существуют данные об эффективном применении позитронно-эмиссионной томографии с использованием ^{18}F -фтордезоксиглюкозы для диагностики РЯ [13].

В 2015 г. продемонстрирована потенциальная избирательная цитотоксичность посредством таргетного воздействия на различные метаболические характеристики клеток карцином яичника: было обнаружено, что при РЯ сверхэкспрессирован транспортер глюкозы типа 1 (GLUT1) [14]. В данном исследовании описана селективная цитотоксичность ресвератрола в клетках карцином яичника посредством регуляции метаболизма глюкозы с помощью модуляции GLUT1. Показано, что ресвератрол селективно ингибирует поглощение глюкозы и индуцирует апоптоз независимо от статуса p53 *in vitro*, не влияет на экспрессию GLUT1 (уровни мРНК и белка), но прерывает внутриклеточный перенос GLUT1 через плазматическую мембрану. Было обнаружено, что такая супрессия GLUT1 при РЯ связана с ингибированием активности Akt. В совокупности эти данные свидетельствовали о том, что ресвератрол индуцирует апоптоз в клетках карцином яичника посредством нарушения усвоения глюкозы [14].

Транспортеры глюкозы GLUT1, GLUT3 и гликолитический фермент гексокиназа II сверхэкспрессируются в некоторых опухолевых клетках и являются показателем плохого прогноза при различных злокачественных новообразованиях, включая и РЯ [15]. D. Suh и соавт. по результатам иммуногистохимического исследования экспрессии гексокиназы II в 111 образцах карцином яичника показали взаимосвязь ее гиперэкспрессии с химиорезистентностью, низкой безрецидивной выживаемостью и худшей общей выживаемостью [16].

Результаты эпидемиологических и доклинических исследований указывают на ключевое значение метаболизма глюкозы при РЯ. Противоопухолевый механизм лекарственного средства 1-й линии терапии сахарного диабета 2-го типа метформина связан с ингибированием mTOR, иммуномодулирующим действием препарата на раковые клетки. Согласно доклиническим данным метформин может ингибировать апоптоз, а также увеличивает популяцию Т-клеток эффекторной памяти, тем самым усиливая иммунный ответ против опухолевых клеток [17]. Строма опухоли пациентов при терапии метформином проявляет более низкую экспрессию IL-6, обусловленную подавлением передачи сигналов нуклеинового фактора κB . Показан новый механизм метформина в подавлении прогрессирования РЯ за счет уменьшения индуцированной

химиотерапией стромальной активации, и предложено его включение в схему комбинированной терапии для улучшения химиочувствительности при РЯ.

Большая часть исследований по изучению роли метформина касается рака молочной железы и рака эндометрия. В исследовании II фазы при диссеминированном РЯ показано, что метформин оказывает противоопухолевый эффект, опосредованный воздействием на опухолевые стволовые клетки [18].

С учетом скомпрометированности иммунной системы у пациентов с резистентностью к инсулину предполагается, что терапия метформином может приводить к различным противоопухолевым эффектам, в связи с чем рекомендуется оценивать результаты лечения в соответствии со статусом резистентности [19].

Исследование V.O. Shender и соавт. (2014), посвященное изучению большого количества метаболитов и белков в асците в целях исключения компонентов, определяемых системным ответом, связанным с образованием асцита, также было проведено в аспекте сравнения с асцитом цирротического происхождения. Из всех изучаемых параметров был выявлен 41 метаболит, концентрация которого была значимо выше при раке, чем при циррозе. При этом большинство идентифицированных метаболитов было представлено важными сигнальными молекулами [20]. Авторы показали, что содержание гликолята, глюкозы, фуранозы и фруктозы было значительно ниже, тогда как глицерин-3-фосфата, холестерина, церамида и моноацилглицерина — гораздо выше у пациенток с асцитом при РЯ [20]. Церамид, производные жирных кислот [21] и LPA (лизофосфатидиловая кислота — продукт расщепления лецитина) были идентифицированы только при злокачественном асците [20].

Метаболический фенотип рака в настоящее время рассматривается как важная мишень для противораковой терапии.

Белковый компонент асцита

Асцитическая жидкость содержит большое количество ростовых факторов. Список ростовых факторов, идентифицированных в асците при РЯ, представлен в табл. 1.

В изучении важное место занимают параметры системы инсулиноподобных факторов роста (IFR).

Система IFR включает IFR I, II и рецептор IFR 1-го типа [22, 23]. Регуляция этой системы на клеточном уровне осуществляется 6 белками, связывающими IFR (insulin-like growth factor binding proteins, IFRBP) и расщепляющими их протеиназами. К их числу относят белок, ассоциированный с беременностью (pregnancy-associated plasma protein, PAPP-A), являющийся металлопротеиназой и принимающий участие в гидролизе белков системы IFR. Протеасомы участвуют в регуляции данной системы [24]. При связывании IFR с рецептором активируются множественные сигнальные пути, что ведет к стимуляции клеточной

Таблица 1. Цитокины и ростовые факторы, идентифицированные в асците (данные PubMed за 2014–2018 гг.; ключевые слова: growth factors, ascites, ovarian cancer)

Table 1. Cytokines and growth factors identified in ascites (PubMed 2014–2018 data; key words: growth factors, ascites, ovarian cancer)

Фактор роста Growth factor	Контекст Context	Источник литературы Source
IL-10, VEGF-A	Уровень IL-10 повышен в асците при диссеминированном РЯ в сравнении с I/II стадией и перитонеальным выпотом при доброкачественной патологии. Уровень IL-10 в асците положительно коррелировал со способностью асцита стимулировать миграцию клеток, но не пролиферацию The level of IL-10 in comparison with stage I/II and peritoneal effusion in benign pathology. The level of IL-10 in ascites stimulates cell migration, but not proliferation	[25]
	Только одновременная блокада PD-1 и нейтрализация IL-10 приводит к улучшению выживаемости и замедлению роста опухоли при РЯ. Компенсаторное высвобождение IL-10 приводит к снижению эффективности монотерапии анти-PD-1 (или анти-PD-L1) Only simultaneous blockade of PD-1 and neutralization of IL-10 leads to improved survival and slowed tumor growth in OC. Compensatory release of IL-10 reduces the effectiveness of anti-PD-1 (or anti-PD-L1) monotherapy	[26]
	Более высокие уровни IL-6 и VEGF-A в асцитической жидкости связаны с меньшей выживаемостью без прогрессирования Higher levels of IL-6 and VEGF-A in ascitic fluid are associated with lower progression-free survival	[27]
IL-6, TNF- α , 8-IP	Уровни IL-6, 8-IP в асците по сравнению с содержанием в плазме выше, а TNF- α — ниже. В случае платинорезистентного и платинорефрактерного течения РЯ наблюдается дисрегуляция между окислителями, антиоксидантами и провоспалительными цитокинами Levels of IL-6, 8-IP in ascites compared with plasma levels are higher, and TNF- α levels are lower. In the case of platinum-resistant and platinum-refractory OC flow, there is dysregulation between oxidants, antioxidants and pro-inflammatory cytokines	[28]
	Комбинация высокого уровня TNF- α и IL-6 до лечения коррелирует с диссеминацией процесса и худшей выживаемостью без прогрессирования The combination of high levels of TNF- α and IL-6 before treatment correlates with dissemination of the process and worse progression-free survival	[9]
IL-6, лептин, CA125 IL-6, leptin, CA125	IL-6 связан с диссеминацией РЯ и может быть использован в дифференциальной диагностике объемных образований яичников в сочетании с сывороточным CA125. Комбинация сывороточного CA125 и асцитного лептина — предиктор резистентности к химиотерапии 1-й линии IL-6 is associated with dissemination of the ovarian cancer and can be used in the differential diagnosis of ovarian volume lesions in combination with serum CA125. The combination of serum CA125 and ascitic leptin is a predictor of resistance to 1st-line chemotherapy	[8]
IL-6R	Уровень экспрессии IL-6R на клеточной мембране опухолевых клеток коррелирует с индуцированной асцитом инвазией. Использование нейтрализующих антител к IL-6 подавляет стимулирующее действие асцита на опухоль. Селективное ингибирование с IL-6/IL-6R подавляет экспрессию белков, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом и может быть перспективной терапевтической мишенью The expression level of IL-6R on the cell membrane of tumor cells correlates with ascites-induced invasion. The use of neutralizing antibodies to IL-6 suppresses the stimulating effect of ascites on the tumor. Selective inhibition with IL-6/IL-6R-mediated signaling pathway JAK2-STAT3 inhibits the expression of proteins associated with epithelial-mesenchymal transition, and may be a promising therapeutic target	[29]
IL-10 и PGE2	Содержащиеся в асците IL-10 и PGE2 обладают иммуносупрессивным эффектом за счет комплементарного подавляющего влияния на TLR-опосредованную активацию дендритных клеток при РЯ IL-10 and PGE2 contained in ascites have an immunosuppressive effect due to the complementary inhibitory effect on TLR-mediated activation of dendritic cells in OC	[30]
TRAIL, остеонектин, IL-6 TRAIL, osteonectin, IL-6	Уровни TRAIL, остеонектина и IL-6 связаны с диссеминированным РЯ TRAIL, osteonectin and IL-6 levels are associated with disseminated OC	[10]

Продолжение табл. 1

Continuation of table 1

Фактор роста Growth factor	Контекст Context	Источник литературы Source
Ang-2	Содержание моноцитов, экспрессирующих Tie2 (TEM), высокое как в опухоли, так и в асците и периферической крови. Ang-2 (лиганд Tie2) и увеличение TEM взаимосвязаны: TEM способствуют ангиогенезу посредством IGF I, через стимуляцию Ang-2 (как <i>in vivo</i> , так и <i>in vitro</i>) The content of monocytes expressing Tie2 (TEM) is high both in the tumor and in ascites and peripheral blood. Ang-2 (Tie2 ligand) and increase in TEM are interrelated: TEM promotes angiogenesis through IGF I, through stimulation of Ang-2 (both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>)	[31]
VEGF/VEGFR2, Ang/Tie2	Комбинированное ингибирование путей VEGF/VEGFR2 и Ang/Tie2 обеспечивает больший эффект антиангиогенной терапии у мышей. Антиангиогенная терапия препятствует накоплению асцита The combined inhibition of the VEGF/VEGFR2 and Ang/Tie2 pathways provides a greater effect of antiangiogenic therapy in mice. Antiangiogenic therapy prevents the accumulation of ascites	[32]
	Клинически агрессивный РЯ может быть связан с ранним нарушением регуляции системы ангиогенеза, способствующим образованию асцита. Эти пациенты могут получить пользу от терапевтического ингибирования VEGF Clinically aggressive OC may be associated with early dysregulation of the system of angiogenesis, contributing to the formation of ascites. These patients may benefit from therapeutic inhibition of VEGF	[33]
	VEGF – независимый прогностический фактор для общей выживаемости при любой стадии РЯ VEGF is an independent prognostic factor for overall survival at any stage of OC	[34]
	Интраперитонеальная химиотерапия цисплатином и бевацизумабом приводит к снижению содержания VEGF в асците по сравнению с исходным уровнем Intraperitoneal chemotherapy with cisplatin and bevacizumab leads to a decrease in the content of VEGF in ascites compared with the initial level	[35]
	Ангиогенная активность асцита при РЯ является маркером прогрессирования заболевания, взаимосвязана с VEGF и IL-8 The angiogenic activity of ascites in OC is a marker of disease progression, interconnected with VEGF and IL-8	[36]
	VEGF-C/VEGFR3 способствует прогрессированию РЯ VEGF-C/VEGFR3 contribute to the progression of OC	[37]
IL-17a и IL-21	IL-17a и IL-21 демонстрируют значительное влияние на общую выживаемость, по результатам мультивариантного анализа IL-17a and IL-21 show a significant effect on overall survival, according to the results of a multivariate analysis	[38]
Периостин Periostin	Уровень периостина повышен в асците при РЯ и коррелирует с CD163 ⁺ TAMs. Периостин является важным фактором для привлечения макрофагов в микроокружение опухоли, участвует во взаимодействии макрофагов и клеток карциномы яичника Periostin levels are elevated in ascites with OC and correlated with CD163 ⁺ TAMs. Periostin is an important factor for the involvement of macrophages in the tumor microenvironment, is involved in the interaction of macrophages and ovarian carcinoma cells	[39]
IGF, IGFBPс	Уровень IGF I в асците является независимым предиктором объективного клинического ответа в случае назначения неoadъювантной химиотерапии перед циторедуктивным вмешательством The level of IGF I in ascites is an independent predictor of an objective clinical response in the case of the appointment of neoadjuvant chemotherapy before cytoreductive intervention	[40]
	IGF могут ингибировать DC-опосредованный противоопухолевый иммунитет, а ингибитор IGF IR может его восстанавливать. Блокада IGF является потенциальной стратегией иммунотерапии рака IGF can inhibit DC-mediated antitumor immunity, and an IGF inhibitor IR can restore it. IGF blockade is a potential cancer immunotherapy strategy	[41]
PAPP-A	Асцит содержит намного более высокие уровни PAPP-A по сравнению с сывороткой. Как растворимый в асците, так и связанный с тканями, PAPP-A стимулирует опосредованный IGF IR рост опухоли Ascites contains much higher levels of PAPP-A compared with serum. As soluble in ascites and associated with tissues, PAPP-A stimulates IGF-mediated IR tumor growth	[41]

Окончание табл. 1

The end of table 1

Фактор роста Growth factor	Контекст Context	Источник литературы Source
TGFβ	Модуляция передачи сигналов с TGFβ с использованием ингибитора рецептора типа 1 SB-431542 блокирует эндогенную активацию EMT у сфероидов, а повторная обработка сфероидов SB-431542 после повторного присоединения усиливает эпителиальный фенотип клеток, значительно снижая их подвижность и миграцию Modulation of TGFβ signaling using the TGFβ type 1 receptor inhibitor SB-431542 blocks endogenous EMT activation in spheroids, and repeated treatment of SB-431542 spheroids after reattachment enhances the epithelial cell phenotype, significantly reducing their mobility and migration	[42]
FGF basic, PDGF-AB/ PDGF-BB, TSP-2, FGF acidic, HB-EGF	По результату оценки экспрессии 55 факторов, связанных с ангиогенезом, выделено 25, диагностическая точность которых в отношении определения чувствительности к антиангиогенным препаратам приближена к 90 %, превышает значимость клинических параметров (стадия, гистотип, размер остаточной опухоли) и уровень VEGF в асците. Из исследуемых 25 параметров 5 обладают наибольшей точностью The evaluation of the expression of 55 factors associated with angiogenesis highlighted 25, the diagnostic accuracy of which in relation to determining sensitivity to antiangiogenic drugs is close to 90 %, exceeds the significance of clinical parameters (stage, histotype, size of residual tumor) and the level of VEGF in ascites. Of the 25 parameters studied, 5 are the most accurate	[43]

Примечание. IL — интерлейкин; VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста; РЯ — рак яичников; PD-1 — рецептор программируемой клеточной смерти 1; TNF-α — фактор некроза опухоли α; 8-IP — 8-изопропан; CA125 — раковый антиген 125; PGE2 — простагландин E2; TLR — Toll-подобный рецептор; TRAIL — цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз; Ang-2 — ангиопоэтин 2; Tie2 — рецептор ангиопоэтинов 1, 2; CD163⁺ TAMs — CD163⁺ опухоль ассоциированные макрофаги; IGF — инсулиноподобный фактор роста; IGFBP — протеины, связывающие инсулиноподобные факторы роста; DC — дендритные клетки; PAPP-A — ассоциированный с беременностью протеин плазмы А; TGFβ — трансформирующий ростовой фактор β; SB-431542 — таргетный ингибитор TGFβ-сигнального каскада; FGF basic — основной фактор роста фибробластов, PDGF-AB/PDGF-BB — тромбоцитарные факторы роста AB/BB; TSP-2 — тромбоспондин 2; FGF acidic — кислый фактор роста фибробластов; HB-EGF — эпидермальный фактор роста.

Note. IL — interleukin; VEGF — vascular endothelial growth factor; OC — ovarian cancer; PD-1 — programmed cell death 1; TNF-α — tumor necrosis factor α; 8-IP — 8-isopropanes; CA125 — cancer antigen 125; PGE2 — prostaglandin E2; TLR — targeting toll-like receptor; TRAIL — tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Ang-2 — angiopoietin-2; Tie2 — angiopoietin receptor; CD163⁺ TAMs — CD163⁺ tumor-associated macrophages; IGF — insulin-like growth factor; IGFBP — insulin-like growth factor-binding protein; DC — dendritic cells; PAPP-A — pregnancy-associated plasma protein A; TGFβ — transforming growth factor β; SB-431542 — transforming growth factor β signaling inhibitor; FGF basic — fibroblast growth factor 2, basic; PDGF-AB/PDGF-BB — platelet-derived growth factor AB/BB; TSP-2 — thrombospondin 2; FGF acidic — fibroblast growth factor 1, acidic; HB-EGF — heparin-binding epidermal growth factor.

пролиферации. Имеются данные, что высокий уровень IGFBP-3 до химиотерапии и высокий уровень IGF II после химиотерапии в асците у больных РЯ коррелируют с низкой общей выживаемостью [44, 45].

По результатам изучения параметров системы IGFs, IGFBP-3, IGFBP-4 и металлопротеиназы PAPP-A у 40 больных с карциномами яичников стадии IIIС–IVА было показано, что уровни обоих факторов роста и связывающих белков в асците превышали соответствующие показатели в первичной опухоли более чем в 10 раз. Различий в отношении PAPP-A выявлено не было. В работе был проведен анализ взаимосвязей уровней компонентов ИФР-системы в опухоли и асците. Были выявлены множественные корреляции между уровнями IGFs и IGFBPs в асците, а также между IGF и IGFBPs в опухолях (табл. 2). Максимальный уровень IGF II и PAPP-A выявлен у больных с умеренным количеством асцита (от 200 до 1000 мл) (табл. 3). Уровень металлопротеиназы PAPP-A был значительно выше у пациенток с умеренным и выраженным асцитом по сравнению с больными со следовыми количествами асцита ($p < 0,05$). При большом количестве асцитической жидкости

(>1000 мл) при высоком уровне PAPP-A уровень обоих ростовых факторов, особенно IGF II, снижался ($p < 0,05$). Полученные данные подтверждали наличие множественных взаимосвязей между уровнями IGFs в асците и уровнями IGF и IGFBPs в опухоли [40].

Протеомика асцита. Белки клеточной подвижности

Представляет интерес углубленный протеомный анализ асцитической жидкости при РЯ, опубликованный L. Gortzak-Uzan и соавт. в 2008 г., в котором исследователи используют несколько алгоритмов получения материала из асцита для оценки белкового состава, а также данные протеомного исследования плазмы и мочи больных РЯ. В итоге в составе асцитической жидкости было идентифицировано более 2500 белков и определено 80 устойчиво обнаруживаемых. В общей сложности исследователи предлагают 18 белков, перспективных для дальнейшего изучения [46]. Данные протеины являются представителями различных групп: а) ассоциированные с клеточной пролиферацией, б) связанные с клеточной дифференцировкой и апоптозом, в) участвующие в ремоделировании цитоскелета,

Таблица 2. Значение коэффициентов корреляции Спирмена (R) между концентрациями IGF-ассоциированных белков в опухоли (tumor) и асците (ascites)

Table 2. The value of the Spearman correlation coefficients (R) between the concentrations of IGF-associated proteins in the tumor and ascites

	IGF I _{tumor}	IGF II _{tumor}	IGFBP-3 _{tumor}	IGFBP-4 _{tumor}	PAPP-A _{tumor}	IGF I _{ascites}	IGF II _{ascites}	IGFBP-3 _{ascites}
IGF I _{tumor}			0,387	0,446		0,683	−0,365	0,646
IGF II _{tumor}			−0,471					
IGFBP-3 _{tumor}	0,387	−0,471		0,394		0,650	−0,469	
IGFBP-4 _{tumor}	0,446		0,394		0,356	0,669	−0,687	0,523
PAPP-A _{tumor}				0,356		0,676		0,785
IGF I _{ascites}	0,683		0,650	0,669	0,676			0,836
IGF II _{ascites}	−0,365		−0,469	−0,689				
IGFBP-3 _{ascites}	0,636		0,481	0,553	0,785	0,836		
IGFBP-4 _{ascites}					0,444			
PAPP-A _{ascites}	−0,483							

Примечание. IGF – инсулиновый фактор роста, PAPP-A – ассоциированный с беременностью протеин плазмы А. В таблице представлены только статистически значимые коэффициенты с уровнем значимости $p < 0,05$.

Note. IGF – insulin growth factor, PAPP-A – pregnancy-associated plasma protein A. Only statistically significant coefficients with significance level $p < 0.05$ are presented in the table.

г) связанные с клеточной адгезией и подвижностью, а также с транспортом, метаболическими и протеолитическими процессами.

Так, экспрессия выделенного белка S10011A (Calgizzarin), относящегося к группе белков, связанных с клеточной пролиферацией, регулирующей рост клеток путем ингибирования синтеза ДНК, ассоциировалась с агрессивным течением РЯ [47].

Для другой группы белков, связанных с дифференцировкой клеток и апоптозом, представленной глутатион-S-трансферазой-1, кофилином-1 (CFL1), аполипопротеином Е, лизоцимом С и митохондриальным белком теплового шока, было отмечено, что увеличение глутатион-S-трансферазы-1 взаимосвязано с химиорезистентностью и неблагоприятным прогнозом; для аполипопротеина Е показаны участие в липидном гомеостазе и рост при диссеминированном РЯ, кроме того, его ингибирование приводит к апоптозу на клеточных линиях; белок цитоскелета CFL1 был взаимосвязан с миграцией клеток, агрегацией и дифференцировкой, CFL1 влиял на дифференцировку посредством воздействия на реконструкцию актинового цитоскелета и инвазивные свойства опухоли.

Среди белков, участвующих в ремоделировании цитоскелета, помимо кофилина-1, профилина-1, ARHGD1B (ингибитор диссоциации гуанозина), IQGAP1 (Ras GTPase-activating-like protein-1/белок активатор ГТФазы 1) и галектина-1, были выделены S100A11, аполипопротеин Е и митохондриальный белок теплового шока. Сверхэкспрессия белка IQGAP1, участвующего в перегруппировке цитоскелета путем взаимодействия с различными белками, включая актин,

кальмодулин, CD44, Е-кадгерин, может значительно увеличивать потенциал мигрирующих и инвазивных раковых клеток. Кроме этого, IQGAP1 синтезируется в эндотелиальных клетках и может быть связан с экспрессией VEGFR2, способствуя миграции, пролиферации и ангиогенезу, что, по мнению L. Gortzak-Uzan и соавт., делает его интересным претендентом на маркер предиктивного значения.

В протеомных исследованиях идентифицированы белки, связанные с клеточной адгезией и подвижностью, способные передавать онкогенные сигналы, стимулирующие изменения цитоскелета и подвижности. Часть из них вошли в группу выявленных предикторов: ARHGD1B, LGALS3BP (галектин-3-связывающий белок), HSPG2 (гепаринсульфат протеогликан базальной мембраны) и профилин-1. По результатам исследований L. Gortzak-Uzan и соавт., сверхэкспрессия профилина-1 прослеживается при РЯ всех стадий и при различной степени дифференцировки.

Группа белков, связанных с транспортом, метаболическими и протеолитическими процессами, представлена церулоплазмином, глюкозо-6-фосфат-изомеразой, пероксиредоксином-6 и катепсином D. По некоторым данным, церулоплазмин и распространение опухоли и метастазирование взаимосвязаны [48]. Его уровень транскрипции при РЯ выше, чем при доброкачественной патологии яичников или норме, а высокий сывороточный уровень коррелирует с опухолевой массой. Обнаружение глюкозо-6-фосфат-изомеразы в данном исследовании, ее присутствие в моче человека и увеличение при РЯ согласуются с данными литературы о взаимосвязи этого фактора с инвазией

и метастазированием [49]. Протеаза катепсин D связана с инвазией, метастазированием, пролиферацией опухолевых клеток, апоптозом и ангиогенезом, а также ассоциирована с плохим клиническим исходом. Данными представленного и ранее опубликованных исследований подтверждено наличие катепсина D у больных РЯ в асците и биологических жидкостях — моче и плазме.

В целом представленное L. Gortzak-Uzan и соавт. исследование, проведенное с целью идентифицировать наиболее надежные маркеры РЯ, показало, что протеомика асцитической жидкости может служить ценным инструментом для изучения механизмов химиорезистентности при РЯ.

Стратегия другого исследования асцитической жидкости, позволившая выделить 51 белок-кандидат в биомаркеры, предполагала использование комплексного протеомного анализа с подтверждением данных на независимых асцитах и образцах сыворотки. В результате было выявлено, что концентрации изоферментов пируваткиназы M1/M2, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и мезотелина были незначительно, но статистически значимо выше в асците у больных РЯ по сравнению с группой пациенток с доброкачественными опухолями яичников [50].

Экзосомы. Другой компонент злокачественного асцита представлен внеклеточными везикулами, разновидностью которых являются экзосомы — наноразмерные микропузырьки (диаметром 30–100 нм) эндосомального происхождения. Экзосомы содержат активные молекулы и могут циркулировать по всему организму, потенциально перенося информацию, способную изменять экспрессию генов в других клетках [51]. Ранее было обнаружено, что содержимое экзосом представлено разными специфичными биомаркерами:

опухолевыми супрессорами, фосфопротеинами, протеазами, факторами роста, биоактивными липидами, мутантными онкобелками, онкогенными транскриптами, микроРНК и последовательностями ДНК, включая miR-200c, miR-214, CA125, Muc-1 и CD24 [3, 52].

Экзосомы могут нести информацию о канцерогенезе, риске прогрессирования и прогнозировании выживаемости. Показано, что более высокие уровни CD24 при РЯ указывают на худший прогноз и более низкую выживаемость [53]. Также есть данные о том, что уровни EpCAM и CD24, присутствующие в экзосомах, коррелируют с агрессивностью РЯ [54]. В этом исследовании экзосомы выделялись из асцита больных РЯ и было показано, что цитоплазматическая локализация CD24 наблюдается в опухолях с высоким инвазивным потенциалом.

«Большие» и «малые» асциты

Интересные данные, касающиеся изучения профилей генной экспрессии, получены в 2014 г. у 149 пациенток с III–IV стадией High-Grade серозных карцином с большим (>1000 мл) и малым (<200 мл) объемом асцита [55]. У пациенток с малым объемом асцита обнаружено усиление экспрессии генов иммунного ответа по сравнению с пациентками с большим объемом асцита. Данные иммуногистохимического исследования подтвердили более высокую экспрессию белков, кодируемых генами иммунных рецепторов, в случаях с небольшим уровнем асцита, при этом отмечалась более выраженная инфильтрация ткани опухоли иммунными клетками. Так, гиперэкспрессия CD74 (кластер дифференцировки 74), HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген DR) и TAP-2 (транспортер, ассоциированный с процессингом антигенов 2) во флоатирующих опухолевых клетках чаще наблюдалась

Таблица 3. Уровни IGFs, IGFBPs и PAPP-A (нг/мг белка) в асците у больных с диссеминированными формами рака яичников в зависимости от его объема, Ме (25–75 %)

Table 3. The levels of IGFs, IGFBPs and PAPP-A (ng/mg protein) in ascites in patients with disseminated ovarian cancer, depending on its volume, Me (25–75 %)

Объем асцита Ascites volume	IGF I	IGF II	IGFBP-3	IGFBP-4	PAPP-A
Малый (<200 мл) (n = 10) Small (<200 ml) (n = 10)	1,92 (1,66–2,26)	193 (55,0–378)	96,9 (88,2–166)	5,96 (3,63–12,4)	0,045 (0–0,120)
Умеренный (n = 12) Moderate (n = 12)	3,95 (0,50–9,50)	165 (84,0–281)	268 (100–404)	3,65 (0,60–5,60)	0,370 (0,130–0,495)
Выраженный (n = 33) Severe (n = 33)	3,00 (1,32–5,00)	67,3 (28,7–124) $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$	210 (140–266)	62,3 (51,4–77,8)	0,310 (0,145–0,550) $p_{1,3} < 0,05$ $p_{1,2} < 0,05$

Примечание. $p_{1,2}$ — разница между уровнем белков в образцах со следовыми количествами асцита и умеренным асцитом; $p_{1,3}$ — разница между уровнем белков в образцах со следовыми количествами асцита и выраженным асцитом; $p_{2,3}$ — разница между уровнем белков в образцах с умеренным и выраженным асцитом.

Note. $p_{1,2}$ — the difference between the level of proteins in samples with trace amounts of ascites and moderate ascites; $p_{1,3}$ — the difference between the level of proteins in samples with trace amounts of ascites and marked ascites; $p_{2,3}$ — the difference between the level of proteins in samples with moderate and severe ascites.

Таблица 4. Данные экспрессии CD74, HLA-DR и TAP-2 в опухолевых клетках при раке яичников со значительным и невыраженным объемными асцитами

Table 4. Data on the expression of CD74, HLA-DR and TAP-2 in tumor cells in ovarian cancer with significant and unexpressed bulk ascites

Параметр Parameter	Интенсивность окрашивания Staining intensity	Большой объем асцита ($n = 25$), n (%) High-volume ascites ($n = 25$), n (%)	Малый объем асцита ($n = 26$), n (%) Low-volume ascites ($n = 26$), n (%)	Критерий Вилкоксона p Wilcoxon p value
CD-74	0	5 (20)	1 (3,8)	0,046
	1	7 (28)	5 (19,2)	
	2	13 (52)	20 (76,9)	
HLA-DR	0	9 (36)	3 (11,5)	0,006
	1	9 (36)	6 (23,1)	
	2	7 (28)	17 (65,4)	
TAP-2	1	21 (84)	11 (42,3)	0,002
	2	4 (16)	15 (57,7)	

Примечание. CD-74 — кластер дифференцировки 74, HLA-DR — человеческий лейкоцитарный антиген DR; TAP-2 — транспортер, ассоциированный с процессингом антигенов 2. Оценка исследуемых параметров проводилась иммуногистохимически [56].

Note. CD-74 — differentiation cluster 74, HLA-DR — human leukocyte DR antigen; TAP-2 — a transporter associated with antigen processing-2.

The evaluation of the parameters studied was carried out immunohistochemically [56].

у пациенток с невыраженным асцитом ($p = 0,046$; $0,006$ и $0,002$ соответственно; табл. 4).

Также отмечено, что меньший объем асцита коррелирует с лучшим хирургическим результатом и более продолжительной общей выживаемостью. Таким образом, авторы рассматривают карциномы яичников с небольшим количеством асцита как более благоприятную подгруппу, характеризующуюся усиленным иммунореактивным фенотипом и лучшим клиническим исходом. Результаты также позволили авторам предполагать, что количество асцита может определять целесообразность назначения адъювантной иммунотерапии, что, однако, требует дальнейшего изучения [55].

Ангиогенные факторы в асците. Перспективы развития антиангиогенной терапии при раке яичников

Особую актуальность имеет направление по изучению ангиогенеза при РЯ. Бевацизумаб является наиболее исследованным таргетным препаратом при РЯ, хотя не единственным (ингибиторы тирозинкиназных доменов рецепторов к сосудистому эндотелиальному тромбоцитарному фактору роста, фактору роста фибробластов, а также ингибиторы ангиопоэтина 1, 2).

Известно, что на ранних этапах канцерогенеза VEGF и его рецепторы являются основными драйверами ангиогенеза в опухоли, но в процессе опухолевой прогрессии присоединяются другие пути, ведущие впоследствии к развитию резистентности к бевацизумабу [56]. В настоящее время подход к антиангиогенной терапии заключается в ингибировании не одного эндотелиального фактора (как в случае бевацизумаба), а двух и более сигнальных путей, задействованных в этом процессе. Известно также, что наличие асцита может быть предиктором большей эффективности терапии бевацизумабом [57]. В исследовании S.P. Trachana и соавт. 2016 г. для изучения факторов ангиогенеза использо-

вали асцитическую жидкость больных с диссеминированными формами низкодифференцированных карцином яичников. Авторы предположили, что разработка «ангиогенной сигнатуры» могла бы предсказать прогноз и эффективность антиангиогенной терапии [22]. Клинический материал был представлен 79 образцами асцитической жидкости, полученными от 35 больных с платиночувствительным и 36 пациентов с платинорезистентным течением. В анализ включили 55 параметров, связанных с ангиогенезом. Забор асцита проводили до начала терапии, результаты анализировали постфактум, в результате чего было отобрано 25 факторов, отличавшихся по уровню своей экспрессии, предиктивная значимость которых превышала значение клинических параметров, включая стадию, гистотип, объем остаточной опухоли после циторедуктивной операции и уровень VEGF в асцитической жидкости. Попытки сократить количество параметров с использованием ELISA (иммуноферментного анализа) и математического моделирования привели к выделению 5 факторов, обладающих наибольшими различиями в экспрессии в химиорезистентной и химиочувствительной группах (FGF acidic, FGF basic, HB-EGF, PDGF-AB/PDGF-BB, тромбоспондин 2). Однако если прогностическое значение модели с учетом 25 параметров приближается к 90 %, то использование только 5 указанных факторов значительно снижает возможность прогнозировать химиорезистентность. Полученные результаты могут учитываться при планировании клинических исследований [22].

Значительные усилия прилагаются для поиска путей прогнозирования эффекта назначения ингибитора ангиогенеза бевацизумаба путем внедрения субклассифицирования карцином в клиническую практику [58, 59]. В исследовании ICON7 пациентки распределены на 4 группы: иммунореактивный ($n = 122$, 34 %),

пролиферативный ($n = 96$, 27 %), дифференцированный ($n = 73$, 20 %) и мезенхимальный ($n = 68$, 19 %) подтипы. Оказалось, что пациентки с опухолями пролиферативного подтипа получили наибольшую пользу от назначения бевацизумаба в адъювантном и поддерживающем режимах (до 12 мес после выполнения первичной циторедукции): отмечено улучшение медианы безрецидивной выживаемости на 10,1 мес. У больных с мезенхимальным подтипом было статистически незначимое улучшение безрецидивной выживаемости на 8,2 мес. В группе пациенток с иммунореактивным подтипом безрецидивной выживаемости — выше на 3,8 мес ($p = 0,08$), как и в группе с дифференцированным подтипом (3,7 мес; $p = 0,61$). Данные многофакторного анализа подтвердили значительное улучшение безрецидивной выживаемости в группе с пролиферативным подтипом ($p = 0,0015$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярные подтипы с худшими показателями выживаемости (пролиферативный и мезенхимальный) получают наибольшую выгоду от лечения, включающего бевацизумаб [59].

Другой анализ включал оценку экспрессии 63 генов и позволил выделить 3 группы опухолей: с гиперэкспрессией ангиогенных генов, со сниженной экспрессией ангиогенных генов и с гиперэкспрессией генов иммунного ответа [60]. Оказалось, что в ангиогенной группе отмечена незначительная тенденция к увеличению безрецидивной выживаемости при добавлении бевацизумаба (17,4 мес против 12,3 мес только с химиотерапией). В иммунной группе (41 % случаев), изначально имеющей более высокие показатели выживаемости по сравнению с двумя другими подгруппами, добавление бевацизумаба приводило даже к ухудшению показателей выживаемости по сравнению с таковыми у больных, получавших только химиотерапию [58].

Ожидается, что общее согласие относительно того, как определять молекулярные подгруппы, облегчит использование данных экспрессии в планировании клинических исследований и терапии в целом. Идентификация опухолей «определенного» подтипа является важным шагом к выделению перспективных терапевтических фенотипов [60].

Составляющие асцита как изменяющиеся параметры.

При изучении параметров генной экспрессии опухолевых клеток асцитической жидкости до лечения и при появлении признаков прогрессирования было выявлено, что, с одной стороны, в резистентных опухолевых клетках асцита обнаруживается сдвиг глюкозозависимой митохондриальной функции в виде усиления экспрессии GLDC, ACC, ASNS, FDFT1, UGDH, PYCR2 и т. д. для биосинтеза вторичных метаболитов, таких как глицин/серин, жирные кислоты, аспартат, холестерин, гиалуоновая кислота, пролин, что может быть связано с обеспечением выживания свободно флотирующих и находящихся в условиях гентоксического стресса химиорезистентных опухолевых клеток,

так как в настоящее время нет сомнений, что трансформации на уровне энергообеспечения позволяют раковым клеткам выживать в условиях гипоксии, а высокий уровень липогенеза в опухолях за счет повышенного обмена глюкозы, глутамина и ацетата независимо от уровня внеклеточных липидов поддерживает агрессивный рост опухолей, усиление активности компонентов пентозофосфатного пути позволяет синтезировать нуклеиновые кислоты на высокой скорости, что в итоге необходимо как для синтеза жирных кислот, так и для выживаемости клеток в условиях окислительного стресса.

С другой стороны, выявлено сопутствующее обогащение белками, связанными с репарацией ДНК (MSH6, TOP2A, CDKN2A, AURKA, AURKB), а также ABCC4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4), известного как MRP 4 (протеин множественной лекарственной резистентности 4), что в целом согласуется с химиорезистентным фенотипом этих клеток [61].

Также выявлены изменения в системе иммунного надзора, различавшиеся в асците первичных больных РЯ (MSH, класс I, адаптивные иммунные молекулы) и в асците химиорезистентных больных (MSH, класс II, адаптивные иммунные молекулы). Что касается экспрессии генов, белковый продукт которых отвечает за гемидесмосомы и клеточную адгезию, подобных белкам семейства плакина (PPL, EVPL, Epiplakin, Plectin и т. д.), то в случае химиорезистентного фенотипа она была снижена, что согласуется с флотирующим состоянием данных клеток.

В итоге у больных РЯ до лечения отмечено повышение содержания белков, отвечающих за иммунный надзор (HLA-B, IDO1, kynureninase и Ly-75), белков, отвечающих за цитоскелет и клеточную адгезию (EVPL, Plectin, Periplakin, EPPK1, CIB-1, ITGB8 и SPTA1) и апоптоз — ANXA9. В химиорезистентных опухолевых клетках наблюдали 2–19-кратное превышение содержания иммунных белков (HLA-DRB1), белков, отвечающих за резистентность к химиотерапии (MSH6, CDKN2A, AURKA, AURKB, TOP2A и ABCC4), белков-онкогенов (MTA1, MIF, DJ-1, Agrin, FDFT1), белков, влияющих на липидный профиль и синтез липидов (PP2A, ACACA, ASNS, UGDH), экстрацеллюлярный матрикс (COL12A, LAMA5, ADAMTS-1), пролиферативных агентов (STAT3, PCNA), а также факторов воспаления (CRP, HP, A2M) [61].

В целом по результатам проведенного анализа литературы наибольшую перспективность для дальнейших исследований в плане прогнозирования течения РЯ имеет ряд интерлейкинов (IL-6, -10, -17a и 21), ростовых факторов (VEGF-A, TNF- α), простагландин E2, параметры системы IFR (IGF I, IGF II и IGFBP-3), протеаза, ассоциированная с беременностью RAPP-A, гликолитический фермент гексокиназа II и глутатион-S-трансфераза-1, белок цитоскелета CFL1 и другие белки клеточной подвижности, протеаза катепсин D, иммунные белки (HLA-DRB1), белки, отвечающие за

резистентность к химиотерапии (MSH6, CDKN2A, AURKA, AURKB, TOP2A и ABCC4), некоторые белки-онкогены, белки, влияющие на синтез липидов и экстрацеллюлярного матрикса, пролиферативные агенты (STAT3, PCNA), факторы воспаления (CRP, HP, A2M). Отдельный интерес представляют экзосомы (содержащие CD24 и EpCAM), а также параметры системы ангиогенеза (VEGF-A, VEGF-C и VEGFR3), хотя попытка создания эффективной «ангиогенной сигнатуры» пока не признана успешной. Эти факторы в совокупности способствуют созданию провоспалительного и иммуносупрессивного микроокружения опухоли.

Заключение

Таким образом, карциномы яичника представляют собой пока недостаточно четко охарактеризованную группу бурно прогрессирующих опухолей, отличающихся выраженной гетерогенностью, отсутствием специфических маркеров химиорезистентности. При этом асцит является привлекательной биологической жидкостью для обнаружения биомаркеров, поскольку получение его требует несложных малоинвазивных манипуляций. Данный обзор посвящен последним достижениям в понимании молекулярных, клеточных и функциональных изменений, касающихся компонентов асцитической жидкости, с целью поиска взаимосвязи с химиорезистентностью.

Асцитическая жидкость, находящаяся в непосредственной близости с опухолью, может отражать события канцерогенеза раньше, чем периферическая кровь: концентрация ряда метаболитов обычно значительно выше в асците по сравнению с сывороткой, и в некотором смысле состав асцита является уникальным. Гетерогенная смесь клеточного компонента асцита определяет состав бесклеточного, а бесклеточный компонент представляет собой динамический резервуар проонкогенных и антионкогенных факторов, включая

цитокины, факторы роста, биоактивные липиды, белки, метаболиты, экзосомы, которые по отдельности и в сочетании влияют на поведение карциномы и особенности прогрессирования. Асцит инициируется и поддерживается за счет физических и биологических изменений, обусловленных основным заболеванием, и образует систему, способствующую прогрессированию болезни: большое количество факторов, формирующих микросреду опухолевых клеток, обеспечивает их пролиферацию и подвижность, регулирует поведение клеток, способствуя гетерогенности опухоли, и различную эффективность химиотерапии.

Представляя собой значительную клиническую проблему, асцит при РЯ открывает широкие возможности в его изучении. Благодаря доступности асцитической жидкости становится отличным объектом для исследования механизмов опухолевой прогрессии, поиска прогностических маркеров, изучения молекулярного профиля. Решение проблемы асцита при РЯ напрямую связано с перспективой появления новых возможностей для терапии диссеминированного РЯ.

Представленные собственные данные свидетельствуют о значимости изучения параметров системы IFR в асцитической жидкости, указывают на множественные взаимосвязи между уровнями IGFs в асците и уровнями IGF и IGFbPs в опухоли. Кроме этого, уровень белков системы IGF существенно зависит от объема асцитической жидкости, что согласуется с представлениями о различном молекулярном профиле низкодифференцированных серозных аденокарцином с малым (<200 мл) и большим (>1000 мл) объемом асцита.

Каждая из имеющихся составляющих асцита может представлять отдельный интерес для исследований. Ключевое результирующее подобных исследований может открыть перед нами возможность новых вариантов как диагностики, так и лечения РЯ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tan D.S., Agarwal R., Kaye S.B. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2006;7(11):925–34. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70939-1.
2. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* 2013;3:256. DOI: 10.3389/fonc.2013.00256.
3. Guo L., Guo N. Exosomes: potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.002.
4. Matte I., Lane D., Laplante C. et al. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res* 2012;2(5):566–80.
5. Lane D., Matte I., Rancourt C., Piché A. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2011;11:210. DOI: 10.1186/1471-2407-11-210.
6. Yigit R., Figdor C.G., Zusterzeel P.L. et al. Cytokine analysis as a tool to understand tumour – host interaction in ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2011;47:1883–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.03.026.
7. Giuntoli R.L., Webb T.J., Zoso A. et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009;29(8):2875–84.
8. Lane D., Matte I., Garde-Granger P. et al. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 2015;15:492. DOI: 10.1186/s12885-015-1511-7.
9. Kolomeyevskaya N., Eng K.H., Khan A.N. et al. Cytokine profiling of ascites at primary surgery identifies an interaction of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in predicting reduced progression-free survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2015;138(2):352–7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.05.009.
10. Huang H., Li Y., Liu J. et al. Screening and identification of biomarkers in ascites

- related to intrinsic chemoresistance of serous epithelial ovarian cancers. *PLoS One* 2012;7(12):e51256. DOI: 10.1371/journal.pone.0051256.
11. McMillan A., Rulisa S., Sumarah M. et al. A multi-platform metabolomics approach identifies highly specific biomarkers of bacterial diversity in the vagina of pregnant and non-pregnant women. *Sci Rep* 2015;5:14174. DOI: 10.1038/srep14174.
 12. Finley L.W., Carracedo A., Lee J. et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell* 2011;19(3):416–28. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.02.014.
 13. Chung H.H., Kwon H.W., Kang K.W. et al. Preoperative [F]FDG PET/CT predicts recurrence in patients with epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2012;23(1):28–34. DOI: 10.3802/jgo.2012.23.1.28.
 14. Gwak H., Haegeman G., Tsang B.K., Song Y.S. Cancer-specific interruption of glucose metabolism by resveratrol is mediated through inhibition of Akt/GLUT1 axis in ovarian cancer cells. *Mol Carcinog* 2015;54(12):1529–40. DOI: 10.1002/mc.22227.
 15. Carvalho K.C., Cunha I.W., Rocha R.M. et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(6):965–72. DOI: 10.1590/s1807-59322011000600008.
 16. Suh D.H., Kim M.A., Kim H. et al. Association of overexpression of hexokinase II with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Med* 2014;14:345–53. DOI: 10.1007/s10238-013-0250-9.
 17. Eikawa S., Nishida M., Mizukami S. et al. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(6):1809–14. DOI: 10.1073/pnas.1417636112.
 18. Buckanovich R.J., Brown J., Shank J. et al. A phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell targeting agent in stage IIc/III/IV ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *J Clin Oncology* 2017;35(Suppl 15):5556. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.5556.
 19. Chae Y.K., Arya A., Malecek M.K. et al. Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies. *Oncotarget* 2016;7(26):40767–80. DOI: 10.18632/oncotarget.8194.
 20. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(12):3558–71. DOI: 10.1074/mcp.M114.041194.
 21. Hartmann D., Lucks J., Fuchs S. et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(4):620–8. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.
 22. Trachana S.P., Pilalis E., Gavalas N.G. et al. The development of an angiogenic protein “signature” in ovarian cancer ascites as a tool for biologic and prognostic profiling. *PLoS One* 2016;11(6):e0156403. DOI: 10.1371/journal.pone.0156403.
 23. Герштейн Е.С., Исаева Э.Р., Огнерубов Н.А. Компоненты системы инсулиноподобных факторов роста как факторы прогноза и мишени молекулярно-направленной терапии рака яичников. *Вестник Тамбовского университета* 2014;19(1):42–5. [Gershteyn E.S., Isayeva E.R., Ognerubov N.A. Insulin-like growth factor system components as prognostic factors and targets for molecular specific therapy in ovarian cancer. *Vestnik Tambovskogo universiteta = Tambov University Reports* 2014;19(1):42–5. (In Russ.)].
 24. Firth S.M., Baxter R.C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002;23:824–54. DOI: 10.1210/er.2001-0033.
 25. Lane D., Matte I., Garde-Granger P. et al. Ascites IL-10 promotes ovarian cancer cell migration. *Cancer Microenviron* 2018;11(2, 3):115–24. DOI: 10.1007/s12307-018-0215-3.
 26. Lamichane P., Karyampudi L., Shreeder B. et al. IL-10 release upon PD-1 blockade sustains immunosuppression in ovarian cancer. *Cancer Res* 2017;77(23):6667–78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0740.
 27. Dalal V., Kumar R., Kumar S. et al. Biomarker potential of IL-6 and VEGF-A in ascitic fluid of epithelial ovarian cancer patients. *Clin Chim Acta* 2018;482:27–32. DOI: 10.1016/j.cca.2018.03.019.
 28. Cantón-Romero J.C., Miranda-Díaz A.G., Bañuelos-Ramírez J.L. et al. Markers of oxidative stress and inflammation in ascites and plasma in patients with platinum-sensitive, platinum-resistant, and platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:2873030. DOI: 10.1155/2017/2873030.
 29. Kim S., Gwak H., Kim H.S. et al. Malignant ascites enhances migratory and invasive properties of ovarian cancer cells with membrane bound IL-6R *in vitro*. *Oncotarget* 2016;7(50):83148–59. DOI: 10.18632/oncotarget.13074.
 30. Brencicova E., Jagger A.L., Evans H.G. et al. Interleukin-10 and prostaglandin E2 have complementary but distinct suppressive effects on Toll-like receptor-mediated dendritic cell activation in ovarian carcinoma. *PLoS One* 2017;12(4):e0175712. DOI: 10.1371/journal.pone.0175712.
 31. Wang X., Zhu Q., Lin Y. et al. Crosstalk between TEMs and endothelial cells modulates angiogenesis and metastasis via IGF1-IGF1R signalling in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2017;117(9):1371–82. DOI: 10.1038/bjc.2017.297.
 32. Tuppurainen L., Sallinen H., Karvonen A. et al. Combined gene therapy using AdsVEGFR2 and AdsTie2 with chemotherapy reduces the growth of human ovarian cancer and formation of ascites in mice. *Int J Gynecol Cancer* 2017;27(5):879–86. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000973.
 33. Bekes I., Friedl T.W., Köhler T. et al. Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer? *Mol Cancer* 2016;15:13. DOI: 10.1186/s12943-016-0497-3.
 34. Zhan N., Dong W.G., Wang J. The clinical significance of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Tumour Biol* 2016;37(3):3719–25. DOI: 10.1007/s13277-015-4198-0.
 35. Zhao H., Li X., Chen D. et al. Intraperitoneal administration of cisplatin plus bevacizumab for the management of malignant ascites in ovarian epithelial cancer: results of a phase III clinical trial. *Med Oncol* 2015;32(2):292. DOI: 10.1007/s12032-014-0292-1.
 36. Gawrychowski K., Szweczyk G., Skopińska-Różewska E. et al. The angiogenic activity of ascites in the course of ovarian cancer as a marker of disease progression. *Dis Markers* 2014;2014(683757). DOI: 10.1155/2014/683757.
 37. Decio A., Tarabozetti G., Patton V. et al. Vascular endothelial growth factor c promotes ovarian carcinoma progression through paracrine and autocrine mechanisms. *Am J Pathol* 2014;184(4):1050–61. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.12.030.
 38. Chen Y.L., Chou C.Y., Chang M.C. et al. IL17a and IL21 combined with surgical status predict the outcome of ovarian cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 2015;22(5):703–11. DOI: 10.1530/ERC-15-0145.
 39. Tang M., Liu B., Bu X., Zhao P. Cross-talk between ovarian cancer cells and macrophages through periostin promotes macrophage recruitment. *Cancer Sci* 2018;109(5):1309–18. DOI: 10.1111/cas.13567.
 40. Yunusova N.V., Villert A.B., Spirina L.V. Insulin-like growth factors and their binding proteins in tumors and ascites of ovarian cancer patients: association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(12):5315–20. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.12.5315.

41. Huang C.T., Chang M.C., Chen Y.L. et al. Insulin-like growth factors inhibit dendritic cell-mediated anti-tumor immunity through regulating ERK1/2 phosphorylation and p38 dephosphorylation. *Cancer Lett* 2015;359(1):117–26. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.007.
42. Thomsen J., Hjortebjerg R., Espelund U. et al. PAPP-A proteolytic activity enhances IGF bioactivity in ascites from women with ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2015;6(31):32266–78. DOI: 10.18632/oncotarget.5010.
43. Rafahi S., Ramos Valdes Y., Bertrand M. et al. TGF β signaling regulates epithelial-mesenchymal plasticity in ovarian cancer ascites-derived spheroids. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(3):147–59. DOI: 10.1530/ERC-15-0383.
44. Spirina L.V., Bochkareva N.V., Kondakova I.V. et al. Regulation of insulin-like growth NF- κ B proteasome system in endometrial cancer. *Mol Biol* 2012;46(3):407–13. DOI: 10.1134/S0026893312020173.
45. Slipicevic A., Øy G.F., Askildt I.C. et al. Diagnostic and prognostic role of the insulin growth factor pathway members insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding protein-3 in serous effusions. *Hum Pathol* 2009;40(4):527–37. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.10.003.
46. Gortzak-Uzan L., Ignatchenko A., Evangelou A.I. et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res* 2008;7:339–51. DOI: 10.1021/pr0703223.
47. Kikuchi N., Horiuchi A., Osada R. et al. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: An important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* 2006;97(10):1061–9. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00295.x.
48. Kluger H.M., Kluger Y., Gilmore-Hebert M. et al. CDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84(3):320–31. DOI: 10.1038/labinvest.3700044.
49. Haga A. A possibility that AMF will serve as a target molecule for the diagnosis and treatment of a metastatic neoplasm. *Yakugaku Zasshi* 2005;25(2):169–75. DOI: <https://doi.org/10.1248/yakushi.125.169>.
50. Elschenbroich S., Ignatchenko V., Clarke B. et al. In-depth proteomics of ovarian cancer ascites: combining shotgun proteomics and selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Proteome Res* 2011;10(5):2286–99. DOI: 10.1021/pr1011087.
51. Valadi H., Ekström K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654–9. DOI: 10.1038/ncb1596.
52. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110(1):13–21. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
53. Aktaş I.Y., Buğdayci M., Usubütün A. Expression of p16, p53, CD24, EpCAM and calretinin in serous borderline tumors of the ovary. *Türk Patoloji Derg* 2012;28(3):220–30. DOI: 10.5146/tjpath.2012.01128.
54. Runz S., Keller S., Rupp C. et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol* 2007;107(3):563–71. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.08.064.
55. Feigenberg T., Clarke B., Virtanen C. et al. Molecular profiling and clinical outcome of high-grade serous ovarian cancer presenting with low-versus high-volume ascites. *Bio Med Research International* 2014;(11):367103. DOI: 10.1155/2014/367103.
56. Keith B., Simon M. Tumor angiogenesis. In: *The Molecular Basis of Cancer*. 3rd Edn. Eds.: J. Mendelsohn, J.W. Gray. Elsevier, 2008. Pp. 241–251.
57. Ferriss J.S., Java J.J., Bookman M.A. et al. Ascites predicts treatment benefit of bevacizumab in front-line therapy of advanced epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers: an NRG Oncology/GOG study. *Gynecol Oncol* 2015;139:17–22. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.07.103.
58. Gourley C., McCavigan A., Perren T. et al. Molecular subgroup of high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) as a predictor of outcome following bevacizumab. *J Clin Oncol* 2014;32(Suppl.15):5502. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.5502.
59. Helland Å., Anglesio M.S., George J. et al. Deregulation of MYCN, LIN28B and LET7 in a molecular subtype of aggressive high-grade serous ovarian cancers. *PLoS One* 2011;6(4):e18064. DOI: 10.1371/journal.pone.0018064.
60. Chen G.M., Kannan L., Geistlinger L. et al. Consensus on molecular subtypes of ovarian cancer. *BioRxiv* 2017;162685. DOI: 10.1101/162685.
61. Ahmed N., Thompson E.W., Quinn M.A. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol* 2007;213(3):581–8. DOI: 10.1002/jcp.21240.

Вклад авторов

А.Б. Виллерт: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для собственного анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Л.А. Коломиец: разработка дизайна научного направления и исследования;

Н.В. Юнусова: получение данных для собственного анализа, анализ полученных данных.

Authors' contributions

A.B. Villert: reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for own analysis, analysis of the obtained data, article writing;

L.A. Kolomiets: development of research design and research;

N.V. Yunusova: obtaining data for own analysis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Б. Виллерт/A.B. Villert: <https://orcid.org/0000-0002-2773-1917>

Л.А. Коломиец/L.A. Kolomiets: <https://orcid.org/0000-0002-6854-8940>

Н.В. Юнусова/N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 20.02.2019. **Принята к публикации:** 17.06.2019.

Article received: 20.02.2019. **Accepted for publication:** 17.06.2019.

Клинико-генетические аспекты дифференциальной диагностики наследственного неполипозного колоректального рака

А.В. Семьянихина¹, А.О. Расулов², Л.Н. Любченко^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Александра Владимировна Семьянихина alexandra_silina@mail.ru

Синдром Линча длительное время являлся синонимом наследственного неполипозного колоректального рака, однако после картирования генов системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR) и выделения синдрома Линча в самостоятельную единицу в группе наследственного неполипозного колоректального рака определился ряд схожих синдромов, фенотипически мимикрирующих с наиболее частым наследственным вариантом рака толстой кишки, но генетически представляющих собой гетерогенную группу. В настоящей статье описаны современные представления о клинических и генетических характеристиках синдрома Линча и подобных ему состояний.

Ключевые слова: синдром Линча, Линч-подобный синдром, наследственный неполипозный колоректальный рак, рак толстой кишки

Для цитирования: Семьянихина А.В., Расулов А.О., Любченко Л.Н. Клинико-генетические аспекты дифференциальной диагностики наследственного неполипозного колоректального рака. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(2):21–7.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-21-27

Clinical and genetic aspects of differential diagnostics of hereditary non-polyposis colorectal cancer

A.V. Semyanikhina¹, A.O. Rasulov², L.N. Lyubchenko^{1,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

³Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Lynch syndrome was synonymous with hereditary non-polyposis colorectal cancer for a long time, however, mapping of the DNA mismatch repair (MMR) genes has led to distinguish Lynch syndrome as an independent syndromic unit from a number of Lynch-like syndromes that phenotypically mimic with the most frequent hereditary variant of colon cancer but genetically representing quite a heterogeneous group. This article presents up to date clinical and genetic characteristics of Lynch syndrome and Lynch-like conditions.

Key words: Lynch syndrome, Lynch-like syndrome, colorectal cancer, hereditary non-polyposis colorectal cancer

For citation: Semyanikhina A.V., Rasulov A.O., Lyubchenko L.N. Clinical and genetic aspects of differential diagnostics of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):21–7.

В подавляющем большинстве случаев (~70 %) рак толстой кишки (РТК) является спорадическим, т.е. обусловленным чередой молекулярно-генетических изменений в клетках эпителия толстой кишки [1, 2]. Примерно у трети больных РТК удается проследитьотягощенный онкологический семейный анамнез, но лишь у 2–3 % диагностируют герминальный дефект, ассоциированный с наследственным вариантом колоректального рака, самым частым из которых является синдром Линча (СЛ), составляющий 2–4 % всех случаев РТК [2, 3].

В целом наследственный неполипозный колоректальный рак можно условно подразделить на 2 группы:

вариант с микросателлитной нестабильностью (microsatellite instability, MSI) и герминальными мутациями в генах системы репарации неспаренных оснований ДНК (MMR) и наследственный рак с интактной системой репарации, т.е. с отсутствием MSI [4]. В 1-ю группу входят СЛ и синдром конститутивного дефицита в системе репарации (биаллельная герминальная инактивация генов системы MMR). Вторая группа включает синдром, ассоциированный с мутациями в генах *POLE*, *POLD1*, и семейный колоректальный рак типа Х (СКРПХ).

Подтверждение генетического диагноза позволяет определить стратегию клинического наблюдения

и профилактики, лечения и прогнозирования течения заболевания у больных наследственным неполипозным колоректальным раком и их родственников.

Синдром Линча (OMIM 120435)

Синдром Линча — высокопенетрантный аутосомно-доминантный наследственный онкологический синдром, ассоциированный с повышенным риском развития злокачественных новообразований (ЗНО) желудочно-кишечного тракта, в первую очередь РТК, а также рака эндометрия у женщин [5]. Впервые синдром описан в 1966 г. Генри Линчем и соавт. [6]. Позднее был предложен термин «неполипозный колоректальный рак» в целях дифференцирования данного состояния и полипозных вариантов РТК. В 1984 г. название «синдром Линча» было окончательно закреплено и используется по настоящее время в клинической практике [7]. Ежегодно в мире диагностируется около 36–60 тыс. случаев РТК, ассоциированных с СЛ [8]. По данным популяционных исследований, СЛ диагностируют в 1 из 35 и в 1 из 56 вновь зарегистрированных случаев РТК и рака тела матки (РТМ) соответственно [9, 10].

Риск развития РТК в составе СЛ составляет 52–82 % по сравнению с общепопуляционным, где данный показатель составляет около 5 % [11, 12]. РТМ является 2-й самой частой злокачественной опухолью с 40–60 % риском манифестации у женщин [11]. В структуре общей заболеваемости РТМ у женщин на долю Линч-ассоциированных форм приходится около 2–3 % [10, 13]. Другие ЗНО, встречающиеся в составе СЛ, а также риски их развития представлены в таблице.

С внедрением в научную клиническую практику технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) спектр ЗНО, ассоциированных с СЛ, продолжает расширяться. Так, в исследовании L.A. Schwark и соавт. представлены данные о соматическом и герминальном профилях более 15 тыс. образцов опухолей различной локализации. Показано, что почти половина ЗНО с высоким уровнем MSI и герминальными мутациями в генах системы MMR не относились к РТК или РТМ, но представляли собой широкий спектр ЗНО, включая опухоли, не относящиеся к СЛ. Среди последних выявлены мягкотканые саркомы, мезотелиомы, герминогенные опухоли, меланома, опухоли центральной нервной системы и др. [14].

Тем не менее новообразования толстой кишки остаются ведущим клиническим проявлением СЛ. Для Линч-ассоциированного РТК характерно классическое развитие злокачественной опухоли из предшествующей аденомы (тубулярной, реже — villous или тубуло-villous) с интервалом развития около 5 лет. При спорадическом РТК средний временной интервал эволюции аденомы в рак составляет 10 лет [15, 16]. В последнее время теория молекулярного патогенеза РТК у пациентов с СЛ претерпела изменения в пользу феномена dMMR (DNA mismatch repair deficiency) как позднего молекулярно-генетического события, в то

время как на ранних этапах Линч-ассоциированные полипы возникают и развиваются аналогично спорадическим. Биаллельное выключение генов MMR-системы, происходящее на поздних этапах, как отмечено ранее, приводит к накоплению соматических мутаций (в том числе MSI), что, в свою очередь, значительно ускоряет развитие опухоли до инвазивного рака [17].

Рак толстой кишки как компонент СЛ характеризуется рядом клинико-морфологических особенностей [1, 4, 5, 18]:

- средний возраст манифестации РТК составляет 45–50 лет;
- тенденция к правосторонней локализации опухолевого очага (в более молодом возрасте — поражение дистальных отделов ободочной и прямой кишки);
- повышенный риск развития синхронных и метасинхронных ЗНО толстой кишки (16 и 41 % соответственно к 10 и 20 годам наблюдения после диагностирования первичной опухоли);
- наличие единичных полипов толстой кишки (для СЛ нехарактерно множественное полипозное поражение, однако единичные полипы могут встречаться и появляться на протяжении жизни);
- морфологически Линч-ассоциированный РТК характеризуется вариативной гистологической картиной: наряду с классическими аденокарциномами кишечного типа наблюдается высокая частота муцинозных аденокарцином, медулярного и перстневидноклеточного рака;
- высокий процент образований с низкой степенью дифференцировки;
- наличие муцинозного компонента и перстневидных клеток в опухоли;
- лимфоцитарная инфильтрация опухоли.

В 1993 г. герминальные мутации в гене *MSH2* впервые описаны как этиологический фактор развития СЛ [19]. В последующем были открыты другие ключевые звенья системы MMR: гены *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, наследуемые мутации в которых наряду с утратой экспрессии гена *MSH2* вследствие протяженных делеций в гене *EPCAM* задействованы в канцерогенезе ЗНО у пациентов с СЛ [1, 20, 21]. Примерно в 80–90 % случаев патологические изменения затрагивают гены *MLH1* и *MSH2*, в 6–10 % — *MSH6*, гораздо реже — *PMS2* и *EPCAM*. В зависимости от генотипа риски развития ЗНО в составе СЛ разнятся. У пациентов-носителей патологического генотипа *MLH1* в подавляющем большинстве случаев доминируют опухоли толстой кишки, тогда как *MSH2*-генотип характеризуется более высокой частотой ЗНО внекишечных локализаций [22]. Герминальные мутации в гене *MSH6* ассоциированы с меньшим риском развития РТК и более высоким риском РТМ по сравнению с изменениями в генах *MLH1* и *MSH2*. Наиболее показательны различия для носителей патологического генотипа в *PMS2*, риск РТК в данном случае не превышает 15–20 %, риск РТМ — 15 %, а средний возраст

Риск развития различных ЗНО в составе синдрома Линча (адаптировано из [18])

Risk of development of various MTs in LS (adapted from [18])

ЗНО MT	Общепопуляционный риск, % Populational risk, %	MLH1/MSH2 [11, 12]		MSH6 [12, 23]		PMS2 [24]	
		Риск, % Risk, %	Средний возраст манифестации, лет Mean age of manifestation, years	Риск, % Risk, %	Средний возраст манифестации, лет Mean age of manifestation, years	Риск, % Risk, %	Средний возраст манифестации, лет Mean age of manifestation, years
Рак толстой кишки Colon cancer	4,5	52–82	44–61	10–22	54	15–20	61–66
Рак тела матки Uterine cancer	2,7	25–60	48–62	16–26	55	15	49
Рак желудка Stomach cancer	<1	8–13	56	≤3	63	+	70–78
Рак яичников Ovarian cancer	1,6	≤24 [12, 25]	43–45	1 [12, 25]	46	+	42
ЗНО гепатобилиарной системы MTs of the hepatobiliary system	<1	1–4	50–57	н/д na	н/д na	+	н/д na
ЗНО мочевыводящей системы MTs of the urinary system	<1	1–7 [26]	54–60	<1	65	+	н/д na
ЗНО тонкой кишки MTs of the small intestine	<1	3–6	47–49	н/д na	54	+	59
Опухоли головного мозга Brain tumors	<1	1–3	~50	н/д na	н/д na	+	45
Опухоли сальных желез Tumors of the sebaceous glands	<1	1–9	н/д na	н/д na	н/д na	н/д na	н/д na
Опухоли поджелудочной железы Pancreatic tumors	<1	1–6 [27]	н/д na	н/д na	н/д na	н/д na	н/д na

Примечание. ЗНО — злокачественное новообразование; н/д — нет данных; «+» — кумулятивный риск развития рака почки, рака желудка, рака яичников, рака тонкой кишки, рака мочеочника и ЗНО головного мозга составляет 6 % к 70-летнему возрасту [24].
Note. MTs — malignant tumor; LS — Lynch syndrome; na — not available; «+» — cumulative risk of renal, stomach, ovarian, intestinal, ureteral cancers and brain tumors is 6 % by the age of 70 years [24].

манифестации РТК приходится на 6–7-е десятилетие жизни [24].

Совокупность анамнестических, клинических и морфологических данных позволяет на первичном этапе идентифицировать пациентов с формально-генетическим диагнозом СЛ. Согласно разработанным международным критериям «Амстердам II» СЛ можно предполагать у пациентов с РТК или любым другим/другими ЗНО в составе СЛ (РТК, рак тонкой кишки, рак мочеочника, рак почки), при наличии не менее 3 родственников со ЗНО из спектра СЛ, а также при соответствии следующим критериям [28]:

- наличие 1 пораженного родственника I степени родства;
- накопление ЗНО не менее чем в 2 поколениях;
- наличие не менее 1 родственника со ЗНО из спектра СЛ с манифестацией заболевания в возрасте до 50 лет;
- все ЗНО должны быть верифицированы морфологически;

- семейный аденоматозный полипоз должен быть исключен.

Примерно в 50 % случаев у пациентов с подозрением на СЛ при клинко-анамнестическом соответствии критериям «Амстердам II» будет выявлен герминальный дефект в системе генов MMR. Согласно последним представленным статистическим данным 68 % больных с СЛ будут пропущены на додиагностическом этапе в связи с их несоответствием критериям «Амстердам II» [29].

Патологические изменения в системе MMR приводят к появлению микросателлитной нестабильности, характеризующейся изменением числа микросателлитных повторов в опухолевой ДНК. MSI играет важную роль в регуляции клеточного цикла, дифференцировки, апоптоза и ответа на специфическое лечение. Более чем в 90 % случаев РТК в составе СЛ характеризуется высоким уровнем MSI (MSI-High), тогда как в спорадических опухолях этот показатель составляет 10–15 % [1]. Диагностическое значение статуса MSI-Low для исключения СЛ

остается неясным, часто этот показатель встречается при соматической инактивации гена *MSH3* [30].

Иммуногистохимическая (ИГХ) оценка MSI в образцах РТК позволяет выявлять отсутствие или снижение экспрессии генов системы MMR, при этом часто диагностируют сочетанное «выключение» (отсутствие экспрессии) *MSH2* с *MSH6* либо *MLH1* с *PMS2*. Изолированная потеря экспрессии одного из генов *MSH2*, *MSH6* и *PMS2* специфична для СЛ. Изменение экспрессии гена *MLH1* в 12 % спорадических форм РТК может быть обусловлено метилированием его промоторной области и ассоциировано с CIMP-фенотипом и соматическими мутациями в гене *BRAF*, наличие которых ставит под сомнение диагноз СЛ у пациента.

Для более эффективного клинического отбора пациентов с подозрением на СЛ были разработаны, а позже пересмотрены и дополнены критерии Бетезда [31]. Согласно этим критериям ИГХ-исследование в целях оценки экспрессии генов системы MMR или анализ статуса MSI при ПЦР-тестировании должны выполняться в случаях:

- РТК, диагностированного в возрасте моложе 50 лет;
- синхронного, метакронного РТК или сочетания РТК с другими ЗНО из спектра СЛ;
- РТК с гистологическими особенностями у пациента в возрасте до 60 лет: с лимфоидной инфильтрацией с фолликулами (крупноподобными изменениями), с муцинозной или перстневидноклеточной дифференцировкой опухоли, с медулярным подтипом РТК;
- если пациент с РТК имеет отягощенный семейный анамнез: родственника, страдавшего ЗНО из спектра СЛ в возрасте до 50 лет, либо 1 родственника с Линч-ассоциированным заболеванием, независимо от возраста манифестации ЗНО.

Критерии Бетезда чувствительнее Амстердамских, однако они не позволяют отобрать для дальнейшей диагностики 50 % больных с СЛ [18]. В одном из исследований герминальные мутации в генах *MLH1* и *MSH2* были выявлены только в 65 % случаев РТК, которые соответствовали критериям Бетезда [32].

Разработаны также статистические модели, определяющие риск диагноза СЛ у пациентов. К ним относятся PREMM5 [33], MMRpredict [34] и MMRpro [35]. Данные программы эффективны и у здоровых лиц из группы риска в случае отягощенного онкологического семейного анамнеза и невозможности оценки MSI на опухолевом материале ввиду его отсутствия.

В 2016 г. в обновленных рекомендациях NCCN (National Comprehensive Cancer Network) предложен универсальный скрининг СЛ для всех вновь диагностированных случаев РТК с оценкой статуса MSI либо посредством ПЦР-тестирования, либо ИГХ-исследования [18].

Линч-подобный синдром

К истинному Линч-подобному синдрому (ЛПС) принято относить РТК с биаллельной соматической

инактивацией генов системы MMR при отсутствии герминальных мутаций, метилирования промоторной области гена *MLH1* и других признаков зубчатого канцерогенеза (по аналогии с СЛ при ЛПС опухолям толстой кишки предшествуют классические тубуло-виллезные аденомы с диким типом гена *BRAF*) [4]. Существует не менее 4 возможных молекулярных механизмов ЛПС:

- герминальные мутации в других генах (не MMR), приводящие к развитию MSI;
- герминальные мутации в системе MMR-генов, не определяемые стандартными молекулярно-генетическими методами;
- биаллельные соматические мутации в системе MMR-генов;
- мозаицизм, не выявляемый в ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови [36].

В среднем на долю ЛПС приходится около 50–60 % всех случаев РТК с MSI-High [37–39]. В работе M. Antelo и соавт. из 14 больных РТК с MSI-High в возрасте до 50 лет СЛ подтвержден только у 43 % пациентов, а в 57 % случаев диагностирован ЛПС [37].

Синдром конститутивного дефицита в системе репарации (синдром биаллельной инактивации генов системы репарации неспаренных оснований, constitutional (biallelic) mismatch repair deficiency syndrome, C (B) MMRD) (OMIM 276300)

Данный синдром является редкой наследственной патологией, обусловленной биаллельной инактивацией генов системы MMR и ассоциированной с повышенным риском развития и манифестацией ЗНО в парадоксально раннем возрасте. Заболевание развивается при наследовании от обоих родителей инактивирующих герминальных мутаций, которые в подавляющем большинстве случаев встречаются в генах *MSH6* и *PMS2*. При этом сами родители зачастую являются «здоровыми» носителями патологического генотипа без проявления признаков СЛ вследствие невысокой пенетрантности указанных генов в гетерозиготном состоянии [12, 23, 24]. По данным международного консорциума CMMRD, при анализе 20 родословных больных с синдромом CMMRD в анамнезе ни у одного из родителей пациентов онкологический диагноз за период наблюдения не регистрировали [40].

Клинические проявления синдрома CMMRD включают опухолевые поражения головного мозга, РТК и другие ЗНО желудочно-кишечного тракта, гемобласты (лейкозы и лимфомы — чаще Т-клеточные варианты) с манифестацией ЗНО в раннем детском возрасте при наиболее агрессивном варианте течения указанного синдрома. Другие, реже встречающиеся ЗНО — рабдомиосаркомы, опухоли Вильмса и нейробластомы.

В детском возрасте опухоли головного мозга являются самыми частыми проявлениями синдрома CMMRD [41]. Среди гистологических вариантов доминируют глиомы

высокой степени злокачественности, реже нейроэктодермальные опухоли и медуллобластомы.

Аденоматозные полипы толстой и тонкой кишки являются характерной чертой данного синдрома. Число полипов варьирует от единичных до 50. Описаны случаи полипозного поражения желудка [42]. По сравнению с синдромом ювенильного полипоза, который проявляется достаточно рано эпизодами безболевых ректальных кровотечений [43], аденоматозные полипы при CMMRD бессимптомны. При этом для таких полипов характерна быстрая опухолевая прогрессия, закономерная для всех dMMR-опухолей [20, 21].

Примерно в 2/3 случаев у пациентов с синдромом CMMRD диагностируют РТК, средний возраст манифестации которого составляет 16 лет [40–42]. В отличие от СЛ РТК у больных с CMMRD чаще диагностируют в левых отделах толстой кишки [44].

Практически все случаи CMMRD сопровождаются кожными проявлениями в виде пятен цвета «кофе с молоком», что может фенотипически имитировать нейрофиброматоз I типа. Пятна при CMMRD имеют характерные черты, позволяющие отличить их от классических факотоматозных: на гиперпигментированном фоне отмечаются частые малопигментированные участки, при этом границы пятен нечеткие с диффузным распределением пигмента [40].

Спектр опухолевого поражения CMMRD необходимо дифференцировать с синдромом Ли–Фраумени и семейным аденоматозным полипозом. Так, сочетание опухолевого поражения головного мозга и полипоза толстой кишки составляет «ядро» синдрома Тюрко, впервые описанного J. Turcot и соавт. в 1959 г. [45]. В молекулярном патогенезе данного синдрома можно условно выделить 2 ведущих механизма. Согласно F. Paraf и соавт. синдром Тюрко, или ВТР-синдром (Brain Tumor-Poliposis), можно классифицировать как ВТР I типа с ранней манифестацией злокачественных глиом и полипов толстой кишки без тотального полипозного поражения, обусловленного нарушениями в системе генов MMR, и ВТР II типа, при котором опухоли головного мозга (чаще медуллобластомы) в сочетании с классическими кишечными проявлениями у пациентов являются следствием синдрома семейного аденоматозного полипоза, ассоциированного с герминальными мутациями в гене *APC* [46].

Аналогично СЛ, для CMMRD характерен высокий уровень MSI ввиду патологических изменений в системе MMR. В ряде исследований было показано, что у пациентов с первично-множественными ЗНО в составе CMMRD выявляется различный статус MSI в зависимости от локализации опухоли [41, 42]. Так, стабильный уровень экспрессии генов системы репарации MMR характерен для опухолей головного мозга и гемобластозов [41]. В аденомах с низкой степенью дисплазии чаще выявляется MSS, а в аденомах с высокой — MSI-High. Низкая информативность оценки MSI с помощью ПЦР-диагностики в качестве скринингового метода для исключения

CMMRD позволяет рассматривать ИГХ-оценку экспрессии генов системы MMR в качестве первичного теста при верификации генетического диагноза [40, 41]. При этом ДНК-тестирование герминальных мутаций в генах системы MMR не всегда позволяет выявить этиологический молекулярный дефект. Ген *PMS2* имеет порядка 20 псевдогенов, и более чем в 30 % случаев диагностируют варианты с неизвестным клиническим значением или VUS (Variants of Uncertain Significance), что усложняет подтверждение генетического диагноза [14].

Синдром, ассоциированный с мутациями в генах *POLE*, *POLD1*

Синдром, ассоциированный с мутациями в генах *POLE*, *POLD1* (Polymerase Proof Reading Associated Polyposis Syndrome, PPAP), — редкое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, обусловленное герминальными мутациями в экзонуклеазном домене генов *POLE* или *POLD1*. Впервые PPAP описан как самостоятельная единица в 2013 г., т. е. это один из новых синдромов наследственного РТК [47].

Для данного синдрома описаны 2 высокопенетрантные мутации: в генах *POLE* (p. Leu424Val) и *POLD1* (p. Ser478Asn), реже встречаются другие генетические изменения [47]. Хромосомная нестабильность с драйверными мутациями в генах *APC* и *RAS* является первичным механизмом канцерогенеза при PPAP [47].

У пациентов-носителей герминальных мутаций в гене *POLE* наблюдаются полипоз толстого кишечника (5–70 полипов, с манифестацией заболевания в возрасте около 20 лет), РТК, а также аденомы и ЗНО двенадцатиперстной кишки. Патологический *POLE*-фенотип характеризуется полипозом толстого кишечника (3–50 полипов, с манифестацией заболевания в возрасте около 20 лет), повышенным риском развития РТК, РТМ и опухолей головного мозга.

В целом для гена *PPAP* характерна высокая пенетрантность. В работе C. Palles и соавт. в 3 родословных удалось проанализировать 23 пораженных члена семьи, у 13 из которых был диагностирован РТК, у 19 — полипоз толстой кишки [47]. Вариабельность клинической картины синдрома, ассоциированного с мутациями в генах *POLE*, *POLD1*, определяет необходимость проведения дифференциальной диагностики данного состояния в отношении СЛ, семейного аденоматозного полипоза и *MUTYH*-ассоциированного полипоза.

Несмотря на гипермутабельный статус опухолей при синдроме PPAP, где частота мутаций в 100 раз выше, чем в спорадических опухолях с MSS, при ЗНО в составе PPAP MSI отсутствует [47]. Стабильный статус системы репарации MSS при PPAP является основным критерием для исключения СЛ при совпадении клинических проявлений заболевания.

Семейный колоректальный рак типа X

К СКРПХ относятся случаи РТК, соответствующие Амстердамским критериям для отбора пациентов

с подозрением на СЛ, однако при ДНК-диагностике у таких пациентов обнаруживают стабильность системы репарации (MSS/MSI-L) и отсутствие герминальных мутаций в генах системы MMR [2, 33]. Согласно ряду исследований около 50 % пациентов, отвечающих критериям «Амстердам I-II», будут отнесены в последующем в группу СКРПХ [48].

Для РТК в составе синдрома СКРПХ характерны более поздний возраст манифестации по сравнению с СЛ, преимущественно левостороннее поражение толстой кишки, невысокая частота лимфоцитарной инфильтрации опухоли и ее окружения, более высокая степень опухолевой дифференцировки и медленная по сравнению с СЛ опухолевая прогрессия [48]. Риск развития ЗНО толстой кишки у пациентов с СКРПХ повышен в 2 раза по сравнению с общепопуляционным [49].

При СКРПХ частота вторых и последующих первичных опухолей другой локализации не превышает аналогичный показатель при спорадическом РТК [49].

Этиология СКРПХ остается пока неясной. Для описания патогенеза этого генетически гетерогенного синдрома предложен ряд локусов и генов: *PLA2G2A*, *EXO1*, *DUSP10*,

ODC1, *TGFBR2*, *MF12*, *MYNN*, *TLR2*, *PKHD1*, *EIF3H*, *POU5F1P1*, *DQ515897*, *MYC*, *DQ515897*, *DQ486513*, *CB104826*, *POU5F1*, *TGFBR1*, *PTCH*, *XPA*, *SYK*, *GALNT12*, *TLR4*, *CCND1*, *COLCA2*, *COLCA1*, *C11orf53*, *POU2AAF1*, *LARP4*, *DIP2B*, *ATF1*, *POLE*, *BRCA2*, *KLF5*, *KLF12*, *LMO7*, *C12orf17*, *SPRY2*, *GPC5*, *MYCBP2*, *POU4F1*, *BMP4*, *GOLGA5*, *GREM1*, *SCG5*, *CRAC1*, *FMN1*, *HIC1*, *CDH1*, *SMAD7*, *RHPN2*, *BMP2*, *LA*, *MA5*, *CHEK2* [48].

На 1-м этапе генетическая диагностика наследственного неполипозного колоректального рака может вызывать затруднения вследствие гетерогенности и перекреста фенотипических проявлений в этой группе синдромов. Определение статуса MSI с помощью ПЦР-диагностики и/или ИГХ-тестирования, исключение соматических BRAF-мутаций при подозрении на СЛ и герминальных мутаций в генах *APC* и *MUTYH* при олигополипозе, диагностика протяженных мутаций, в том числе в гене *EP-CAM*, применение мультигенных панелей для таргетного секвенирования позволяют верифицировать диагноз наследственного рака, а также персонифицировать диагностику, лечение и профилактику РТК у больных с подозрением на наследственный неполипозный колоректальный рак.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tiwari A.K., Roy H.K., Lynch H.T. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM* 2016;109(3):151–8. DOI: 10.1093/qjmed/hcv137.
2. Lichtenstein P., Holm N.V., Verkasalo P.K. et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *Engl J Med* 2000;343(2):78–85. DOI: 10.1016/S0039-6257(00)00165-X.
3. Giardiello F.M., Allen J.I., Axilbund J.E. et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology* 2014;147(2):502–26. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.001.
4. Carethers J.M., Stoffel E.M. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: the growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(31):9253–61. DOI: 10.3748/wjg.v21.i31.9253.
5. Burt R. Inheritance of colorectal cancer. *Drug Discov Today Dis Mech* 2007;4(4): 293–300. DOI: 10.1016/j.ddmec.2008.05.004.
6. Lynch H.T., Shaw M.W., Magnuson C.W. et al. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966;117(2):206–12. DOI: 10.1001/archinte.1966.03870080050009.
7. Boland C.R., Troncale F.J. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984;100(5):700–1. DOI: 10.7326/0003-4819-100-5-700.
8. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. *Genet Med* 2009;11(1):35–41.
9. Yurgelun M.B., Kulke M.H., Fuchs C.S. et al. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2017;35(10):1086–95. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0012.
10. Hampel H., Frankel W., Panescu J. et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006;66(15):7810–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1114.
11. Kohlmann W., Gruber S.B. Lynch syndrome. *Gene Reviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource*. University of Washington, Seattle. 1993–2014. Available at: <http://www.genetests.org>.
12. Bonadona V., Bonaïti B., Olschwang S. et al. Cancer risks associated with germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011;305(22): 2304–10. DOI: 10.1001/jama.2011.743.
13. Jaspersion K.W., Tuohy T.M., Neklason D.W., Burt R.W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6): 2044–58. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.
14. Latham Schwark A., Srinivasan P., Kemel Y. et al. Pan-cancer microsatellite instability to predict for presence of Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 2018; 36(Suppl 18):LBA1509. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.18_suppl. LBA1509.
15. Ballester V., Rashtak S., Boardman L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(5):1736–44. DOI: 10.3748/wjg.v22.i5.1736.
16. Grady W.M., Markowitz S.D. The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci* 2015;60(3):762–72. DOI: 10.1007/s10620-014-3444-4.
17. Yurgelun M.B., Kastrinos F. Tumor testing for microsatellite instability to identify Lynch syndrome: new insights into an old diagnostic strategy. *J Clin Oncol* 2019;37(4):263–5. DOI: 10.1200/JCO.18.01664.
18. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf.
19. Fishel R., Lescoe M.K., Rao M.R. et al. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75(5):1027–38. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90546-3.
20. Bronner C.E., Baker S.M., Morrison P.T. et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368(6468):258–61. DOI: 10.1038/368258a0.

21. Nicolaides N.C., Papadopoulos N., Liu B. et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371(6492):75–80. DOI: 10.1038/371075a0.
22. Vasen H.F., Stormorken A., Menko F.H. et al. *MSH2* mutation carriers are at higher risk of cancer than *MLH1* mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol* 2001;19(20):4074–80. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.20.4074.
23. Baglietto L., Lindor N.M., Dowty J.G. et al. Risks of Lynch syndrome cancers for *MSH6* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(3):193–201. DOI: 10.1093/jnci/djp473.
24. Senter L., Clendenning M., Sotamaa K. et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line *PMS2* mutations. *Gastroenterology* 2008;135(2):419–28. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.026.
25. Møller P., Seppälä T., Bernstein I. et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut* 2017;66(3):464–72. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309675.
26. Joost P., Therkildsen C., Dominguez-Valentin M. et al. Urinary tract cancer in Lynch syndrome; increased risk in carriers of *MSH2* mutations. *Urology* 2015;86(6):1212–7. DOI: 10.1016/j.urology.2015.08.018.
27. Kastrinos F., Mukherjee B., Tayob N. et al. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 2009;302(16):1790–5. DOI: 10.1001/jama.2009.1529.
28. Vasen H.F., Watson P., Mecklin J.P., Lynch H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116(6):1453–6. DOI: 10.1016/S0016-5085(99)70510-X.
29. Barnettson R.A., Tenesa A., Farrington S.M. et al. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med* 2006;354(26):2751–63. DOI: 10.1056/NEJMoa053493.
30. Haugen A.C., Goel A., Yamada K. et al. Genetic instability caused by loss of *MutS* homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68(20):8465–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0002.
31. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(4):261–8. DOI: 10.1093/jnci/djh034.
32. Raedle J., Trojan J., Brieger A. et al. Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and *MLH1* promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2001; 135(8 Pt 1):566–76. DOI: 10.7326/0003-4819-135-8_Part_1-200110160-00007.
33. <http://premm.dfci.harvard.edu/>.
34. <http://hnpccpredict.hgu.mrc.ac.uk/>.
35. <http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/>.
36. Boland C.R. The mystery of mismatch repair deficiency: Lynch or Lynch-like? *Gastroenterology* 2013;144(5):868–70. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.03.014.
37. Antelo M., Golubicki M., Roca E. et al. Lynch-like syndrome is as frequent as Lynch syndrome in early-onset non-familial non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2019. DOI: 10.1002/ijc.32160.
38. Haraldsdottir S., Hampel H., Tomsic J. et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014;147(6):1308–16e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.08.041.
39. Geurts-Giele W.R., Leenen C.H., Dubbink H.J. et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J Pathol* 2014; 234(4):548–59. DOI: 10.1002/path.4419.
40. Durmo C.A., Sherman P.M., Aronson M. et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015;51(8):977–83. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
41. Bakry D., Aronson M., Durmo C. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014;50(5):987–96. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
42. Durmo C.A., Holter S., Sherman P.M., Gallinger S. The gastrointestinal phenotype of germline biallelic mismatch repair gene mutations. *Am J Gastroenterol* 2010;105(11):2449–56. DOI: 10.1038/ajg.2010.215.
43. Durmo C.A. Colonic polyps in children and adolescents. *Can J Gastroenterol* 2007; 21(4):233–9. DOI: 10.1155/2007/401674.
44. Herkert J.C., Niessen R.C., Olderde-Berends M.J. et al. Paediatric intestinal cancer and polyposis due to bi-allelic *PMS2* mutations: case series, review and follow-up guidelines. *Eur J Cancer* 2011;47(7):965–82. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.01.013.
45. Turcot J., Despres J.P., Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959;2:465–8. DOI: 10.1007/BF02616938.
46. Paraf F., Jothy S., Van Meir E.G. Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 1997;15:2744–58. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.7.2744.
47. Palles C., Cazier J.B., Howarth K.M. et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of *POLE* and *POLD1* predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet* 2013;45(2):136–44. DOI: 10.1038/ng.2503.
48. Zetner D.B., Bisgaard M.L. Familial colorectal cancer type X. *Curr Genomics* 2017;18(4):341–59. DOI: 10.2174/1389202918666170307161643.
49. Lindor N.M., Rabe K., Petersen G.M. et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005;293(16):1979–85. DOI: 10.1001/jama.293.16.1979.

Вклад авторов

А.В. Семьянихина: написание текста рукописи;

О.А. Расулов, Л.Н. Любченко: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

A.V. Semyanikhina: article writing;

A.O. Rasulov, L.N. Lyubchenko: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.В. Семьянихина/A.V. Semyanikhina: <https://orcid.org/0000-0001-8783-8874>

О.А. Расулов/A.O. Rasulov: <https://orcid.org/0000-0002-5565-615X>

Л.Н. Любченко/L.N. Lyubchenko: <https://orcid.org/0000-0003-4775-3299>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 25.03.2019. **Принята к публикации:** 28.05.2019.

Article received: 25.03.2019. **Accepted for publication:** 28.05.2019.

Перспективы таргетной терапии глиом низкой степени злокачественности у детей

Э.Ф. Валиахметова¹, Л.А. Ясько², Л.И. Папуша², А.Е. Друй², А.И. Карачунский^{2,3}

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России; Россия, 125047 Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

³ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Эндже Фаварисовна Валиахметова andgeval@gmail.com

Глиомы низкой степени злокачественности являются преобладающим большинством в структуре опухолей головного мозга у детей. Достичь локального и системного контроля над опухолью возможно при полном удалении образования. Сложная локализация глубоко расположенных и диффузно растущих опухолей ограничивает объем оперативного вмешательства и требует поиска, а также совершенствования методов консервативного лечения данной нозологической группы. Необходимы более эффективные виды лечения как для преодоления рефрактерного течения заболевания, так и для минимизации токсичности, связанной с обычной адъювантной химиотерапией и различными видами лучевой терапии. С учетом того, что в основе молекулярного патогенеза большинства глиом низкой степени злокачественности лежит активация сигнальных путей MAPK (mitogen activated protein kinase) и mTOR (мишени рапамицина млекопитающих), наиболее перспективными агентами — таргетными препаратами являются BRAF, MEK и mTOR-ингибиторы. Тем не менее целый ряд других соединений был исследован в целях поиска перспективных агентов для таргетной терапии при опухолях указанного типа. Обзор суммирует новейшие данные литературы, посвященной новым препаратам при глиоме низкой степени злокачественности.

Ключевые слова: глиома низкой степени злокачественности, таргетная терапия, слияние BRAF:KIAA1549, мутация BRAFV600, субependимальная гигантоклеточная астроцитомы, mTOR, ингибитор тирозинкиназы

Для цитирования: Валиахметова Э.Ф., Ясько Л.А., Папуша Л.И. и др. Перспективы таргетной терапии глиом низкой степени злокачественности у детей. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(2):28–41.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-28-41

Promises of targeted therapy for low grade gliomas in children

E.F. Valiakhmetova¹, L.A. Yasko², L.I. Papusha², A.E. Druy², A.I. Karachunsky^{2,3}

¹N.N. Burdenko National Scientific and Practical Center for Neurosurgery, Ministry of Health of Russia; 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow 125047 Russia;

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianova St., Moscow 117997, Russia

Low grade gliomas are the most common brain tumors in children. Total resection for operable lesion helps to achieve local and system control. Nevertheless, for inaccessible tumors are required more effective treatment both to overcome the refractory course of the disease, and to minimize toxicity with conventional adjuvant chemotherapy and various types of radiation therapy. In recent years, there has been an accelerated understanding of the molecular pathogenesis of some tumors in children, including low grade gliomas. Given the fact that the basis of the molecular pathogenesis of the low grade gliomas is the activation of signaling pathways MARK (mitogen activated protein kinase) and mTOR (mammalian target of rapamycin), the most promising targeted agents are BRAF, MEK and mTOR inhibitors. Nevertheless, a number of other agents have been studied to find promising targeted therapy for this tumors type. This article summarizes the latest literature evaluating new drugs in low grade glioma.

Key words: low grade gliomas, targeted therapy, BRAF:KIAA1549 fusion, BRAFV600 mutation, subependymal giant cell astrocytoma, mTOR, tyrosine kinase inhibitor

For citation: Valiakhmetova E.F., Yasko L.A., Papusha L.I. et al. Promises of targeted therapy for low grade gliomas in children. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2019;6(2):28–41.

Введение

К глиомам низкой степени злокачественности (ГНСЗ) относятся глиальные опухоли I и II степени злокачественности с различными гистологическими,

демографическими и рентгенологическими признаками, которые составляют 30–40 % всех новообразований головного мозга у детей и являются самой распространенной патологией в этой группе заболеваний [1].

Пилоидные астроцитомы (ПА) составляют самую большую гистологическую подгруппу, но диагностика даже этого варианта опухоли может быть затруднительной, особенно когда для анализа доступно небольшое количество опухолевой ткани. В случае смешанных глиально-нейрональных опухолей диагностика других гистопатологических вариантов может быть еще более сложной. В классификации Всемирной организации здравоохранения (2016 г.) для опухолей центральной нервной системы уже идет стыковка гистологической и молекулярно-генетической классификаций для других видов опухоли. Что касается ГНСЗ, то все еще остаются опухоли, которые нельзя систематизировать в соответствии с действующими критериями [2].

У большинства пациентов с ГНСЗ отмечены высокие показатели выживаемости, — на это влияют степень резекции опухоли, наличие диссеминации заболевания, а также дизэнцефального синдрома [3]. Для многих опухолей методом выбора остается хирургическое удаление. В случае полного удаления опухоли 5-летняя бессобытийная и общая выживаемость составляют 80 и 97 % соответственно [3]. Однако при глиомах срединных структур (гипоталамуса, зрительного пути, ствола головного мозга) полное удаление опухоли редкодостижимо. Для локального и системного контроля над этими опухолями используются лучевая и химиотерапия, последняя из которых стала 1-й линией лечения для большинства детей, особенно младшего возраста и детей с нейрофиброматозом 1-го типа (НФ-1), с целью отсрочить лучевую терапию или ее избежать [4]. Изучение наследственных, генетически детерминированных заболеваний, таких как НФ-1 и туберозный склероз, привело к идентификации дисрегуляции сигнальных путей, лежащих в основе формирования ГНСЗ, а открытие того, что в большинстве педиатрических ГНСЗ происходят различные изменения в гене *BRAF*, привело к изменению концепции самого заболевания [5, 6]. Эти новые знания уже ставят под сомнение пригодность применяемого в настоящее время подхода единой тактики для всех доброкачественных глиом. Развитие молекулярно-целевых методов лечения может увеличить эффективность и уменьшить токсичность на нормальное развитие детского организма.

Цель работы — освещение литературы, посвященной таргетной терапии при ГНСЗ у детей.

Ингибиторы митогенактивированной протеинкиназы — *BRAF* и *MEK*-ингибиторы

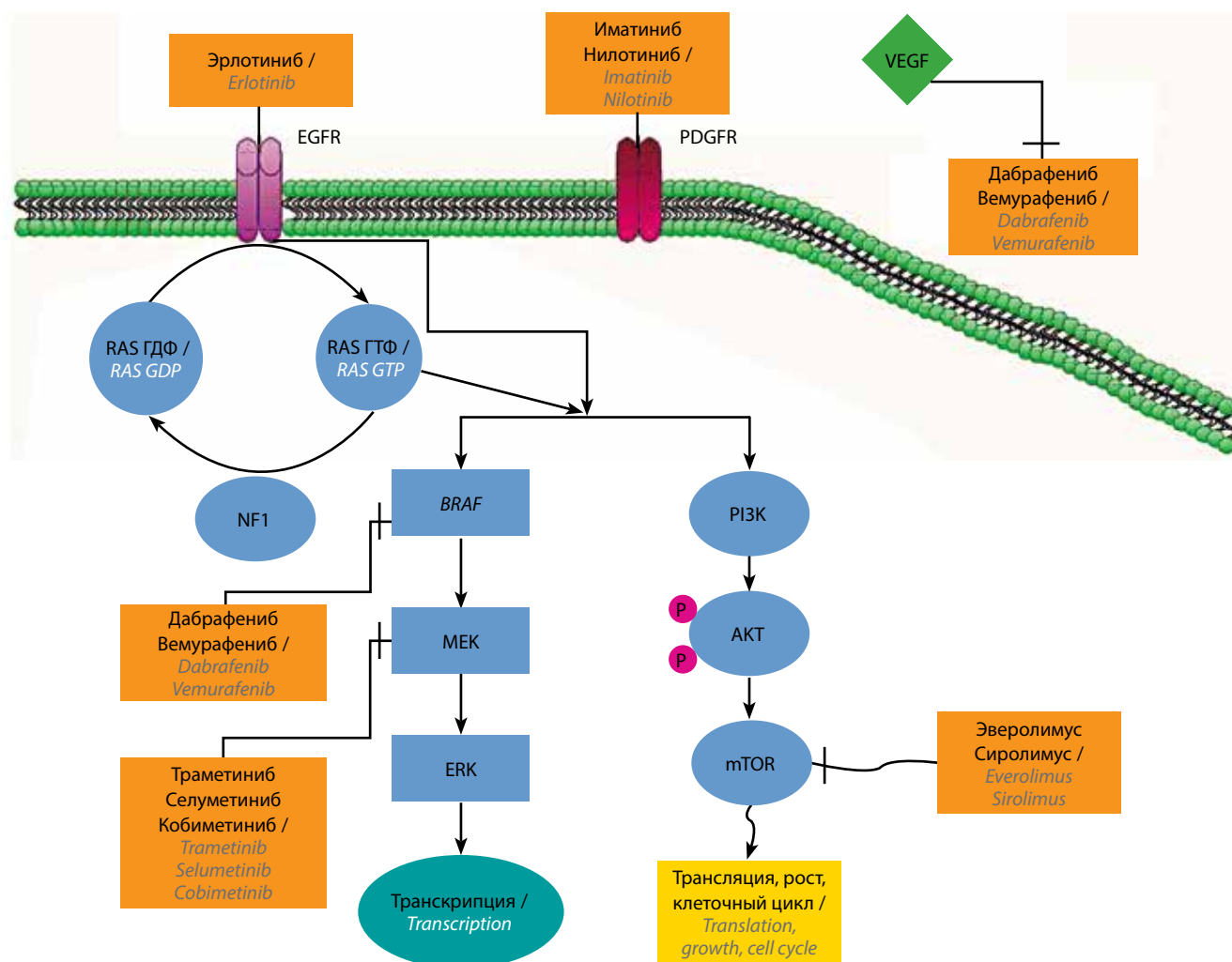
Наиболее частые генетические изменения, выявленные в педиатрических ГНСЗ на сегодняшний день, включают изменения в гене *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1). Это нижележащий член семейства *RAF* серин-треониновых киназ и ключевой регулятор пути митогенактивированной протеинкиназы (МАРК), ответственный за контроль над делением клеток, дифференцировку и инвазию (см. рисунок) [7, 8].

Молекулярно-генетические исследования продемонстрировали, что в большинстве случаев ПА у детей встречается сегментарное удвоение 7q34 [6], приводящее к слиянию гена *BRAF* в районе МАРК-активирующего домена и гена *KIAA1549* [5]. Образующийся химерный транскрипт экспрессируется в более высоком количестве, чем *BRAF* дикого типа, потому что ингибирующий домен, который обычно регулирует активность *BRAF*, теряется. Это слияние является самой распространенной молекулярной аномалией (50–90 %) [9], зарегистрированной при спорадических ПА у детей, особенно расположенных в задней черепной ямке и при глиомах зрительного пути [9, 10]. Несмотря на то что слияние *BRAF:KIAA1549* не встречается у пациентов с НФ-1 [11], мутированный белок НФ-1 также теряет свойственный ему ингибирующий эффект на активность *BRAF* [12], вызывая тем самым лиганд-независимую активацию МАРК-сигналинга. Все это приводит к усилению нисходящего сигналинга (МЕК/ЕРК) и последующему увеличению пролиферации клеток. В настоящее время оцениваются ингибиторы нисходящего пути сигнального каскада МАРК — МЕК (МАРК-extracellular regulated kinase).

МЕК-ингибиторы

Механизм действия. МЕК-1 и -2 являются белками подсемейства МЕК [13]. Ингибирование МЕК-1/-2 является перспективным подходом в лечении ГНСЗ. Структура молекулы МЕК-1/-2 имеет большое преимущество для использования ее как таргетной. Она содержит карман, сохранившийся только в белках МЕК, что при связывании с ингибитором приводит нефосфорилированный МЕК-1/-2 в каталитически неактивное состояние. Благодаря уникальному карману аденозинтрифосфата (АТФ) механизм неконкурентного связывания АТФ не вызывает ингибирования. Это позволяет избежать нежелательных побочных эффектов, связанных с необратимым ингибированием других протеинкиназ, и не вызывает конкурентное связывание с внутриклеточными концентрациями АТФ, что могло бы создавать ряд проблем. Иными словами, гидрофобный аллостерический карман, смежный с АТФ-связывающим сайтом, — уникальное отличие МЕК от других киназ, позволяет селективно ингибировать другой сайт, а не высокоспецифичную АТФ этой зоны. Было разработано несколько соединений с сильной ингибиторной активностью, специфичной для МЕК-1/-2 [14].

Селуметиниб — селективный пероральный неконкурентный ингибитор АТФ, имеющий высокую специфичность к МЕК-1/-2. В настоящее время завершена I фаза клинического исследования (КИ) селуметиниба при рецидивирующих/рефрактерных детских ГНСЗ (см. таблицу). В исследовании были зарегистрированы 38 детей с ГНСЗ — ПА, ганглиоглиомами, олигодендроглиомами, плеоморфными ксантоастроцитомами. У 5 детей выявлен НФ-1. Медиана количества циклов селуметиниба составила 13 (от 1 до 26). Весь протокол



Сигнальные пути, задействованные в патогенезе глиом низкой степени злокачественности, таргетные препараты. ГДФ — гуанозиндифосфат; ГТФ — гуанозинтрифосфат

Signal pathways involved in the pathogenesis of low-grade gliomas, targeted agents. GDP — guanosine diphosphate; GTP — guanosine triphosphate

лечения (26 циклов) завершили 14 (34 %) детей, 53 % всех пациентов завершили как минимум 1 год (13 циклов) терапии.

Оценивали 3 дозы селуметиниба: 33, 43 и 25 мг/м². Дозы 33 и 43 мг/м² были чрезмерно токсичными. Селуметиниб в дозе 25 мг/м² продемонстрировал удовлетворительную переносимость и показал свою эффективность. У 19 пациентов опухолевая ткань была исследована на аберрации в гене *BRAF*: у 10 было обнаружено только слияние *BRAF*:*KIAA1549*, у 2 была только мутация *BRAF*V600E, у 1 — обе аберрации, у 5 не было ни слияния *BRAF*:*KIAA1549*, ни мутации *BRAF*V600E, и у 1 не было мутации *BRAF*V600E, но было недостаточно ткани для оценки слияния *BRAF*:*KIAA1549*, хотя наличие аномалий в гене *BRAF* не являлось необходимым для включения в I фазу этого исследования. В КИ первоначальная оценка ответа со стороны опухоли основывалась на уменьшении контрастируемой части. Оно было зарегистрировано у 11 (44 %) из 25 пациентов, принимавших селуметиниб в дозе 25 мг/м². Модифицированные критерии ответа основывались

главным образом на уменьшении объема опухоли в режиме T2/FLAIR. По этим критериям частичный ответ со стороны опухоли был у 5 (20 %) пациентов. Из них с частичным ответом 2 имели слияние *BRAF*:*KIAA1549*, у 1 была мутация *BRAF*V600E, у 1 — обе аберрации, и у 1 было недостаточно ткани для исследования. Двухлетняя безрецидивная выживаемость у 25 пациентов, получивших селуметиниб в разовой дозе 25 мг/м², составила $69 \pm 9,8$ % [15].

Недавно завершилась II фаза КИ селуметиниба, которая охватила более 100 детей. Уникальной частью этого исследования была возможность повторного лечения пациентов с ГНСЗ, ранее участвовавших в исследовании I фазы, у которых отмечен ответ или длительная стабилизация заболевания по меньшей мере в течение 12 мес во время терапии, а рецидив произошел уже после завершения лечения (ClinicalTrials.gov идентификатор NCT01089101). Полные результаты еще не опубликованы.

Траметиниб — малая молекула, аллостерический неконкурентный АТФ-ингибитор MEK-1 и MEK-2-киназы, ингибирует пролиферацию клеток, но не индуцирует

Данные КИ о применении таргетных препаратов при ГНСЗ у детей
Clinical trial datas on the usage of targeted agents in the pediatric LGG

Препарат/ комбинация препаратов Medicine/ combination of medicine	Молекуляр- ная мишень Molecul target	Тип ГНСЗ type of LGG	Молекулярно- генетические характе- ристики опухолей Molecular-genetic feature of the tumors	Число больных в исследо- ваниях Number of patients in the study	Ответ на лечение Response to treatment	Побочные эффекты Side effects	Фаза КИ Phase of CT	Номер КИ Number of CT	Ссылка на КИ Reference to CT	Ссылка Reference
Селуметиниб Selumetinib	МЕК-1/-2	ПА, ГГ, ПКА, ОДГ PA, GG, PXA, ODG	10 пациентов слияние BRAF:K1AA1549 2 пациента BRAFV600E 1 пациент и BRAF:K1AA1549, и BRAFV600E 10 patients with BRAF: K1AA1549 fusion 2 patients with BRAFV600E mutation 1 – both BRAF:K1AA1549 fusion and BRAFV600E mutation	38	44 % ЧО 44 % PR	III степень токсичности: 1 – увеличение уровня АЛТ/АСТ 1 – головная боль 2 – мукозит 6 – сыпь Grade III toxicity: 1 – ALT/AST increasing 1 – headache 2 – mucositis 6 – rash	I	NCT 01089101	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01089101?term=Selumetinib+AND+MEK+Inhibitor+AZD6244&age=0&rank=3	[15]
Траметиниб Trametinib	МЕК-1/-2	ГНСЗ со слиянием BRAF: K1AA1549 LGG with BRAF: K1AA1549 fusion	Все со слиянием BRAF:K1AA1549 All with BRAF:K1AA1549 fusion	23	4 – ЧО 1 – ПР 7 – исключе- ны из КИ 11 – проходят лечение 4 – PR 1 – PD 7 – excluded from the study 11 – on the treatment	14 – диарея 13 – лихорадка 9 – паронихия 8 – макулопапулезная сыпь 14 – diarrhea 13 – fever 9 – paronychia 8 – maculopapular rash	I/II	NCT 02124772	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02124772	[16]
Вемурафениб Vemurafenib	BRAFV600E	ПА, ГГ PA, GG	Все с мутацией BRAFV600E All with BRAFV600E mutation	19	1 – ПО 2 – ЧО 15 – СЗ 1 – CR 2 – PR 15 – SD	II–III степень токсично- сти: 1 – кератоакантома 16 – сыпь 1 – гипонатриемия 4 – увеличение уровня АЛТ/АСТ 5 – лихорадка Grade II–III toxicity: 1 – keratoacanthoma 16 – rash, 1 – hyponatremia 4 – ALT/AST increasing 5 – fever	II	NCT 01748149	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01748149	[17]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Препарат/ комбинация препаратов Medicine/ combination of medicine	Молекуляр- ная мишень Molecul target	Тип ГНСЗ type of LGG	Молекулярно- генетические характе- ристики опухолей Molecular-genetic feature of the tumors	Число больных в исследо- ваниях Number of patients in the study	Ответ на лечение Response to treatment	Побочные эффекты Side effects	Фаза КИ Phase of CT	Номер КИ Number of CT	Ссылка на КИ Reference to CT	Ссылка Reference
Дабрафениб Dabrafenib	BRAFV600E	ГНСЗ с мутацией BRAFV600E LGG with BRAFV600E mutation	Все с мутацией BRAFV600E All with BRAFV600E mutation	27 (из них 15 с ГНСЗ) 27 (15 with LGG)	8 – ЧО 6 – СЗ 1 – ПР 8 – PR 6 – SD 1 – PD	II–III степень токсичности: 1 – гипотензия 1 – лихорадка 1 – артралгия Grade II–III toxicity: 1 – hypotension 1 – fever 1 – arthralgia	I	NCT 01677741	https:// clinicaltrials. gov/ct2/show/ NCT01677741	[18]
Эверолимус Everolimus	TSC1, TSC2	СЭГА SEGA	Нет данных No data	117 (78 – эве- ролимус; 39 – пла- цебо) 117 (78 – eve- rolimus; 39 – placebo)	35 % – умень- шение размеров опухоли >50 % 35 % – decrease of tumor size >50 %	В группе пациентов, получавших эверолимус: 25 (32 %) – мукозит 24 (31 %) – стоматит 18 (23 %) – судороги 17 (22 %) – лихорадка In everolimus group: 25 (32 %) – mucositis 24 (31 %) – stomatitis 18 (23 %) – seizures 17 (22 %) – fever	III	NCT 00789828	https:// clinicaltrials. gov/ct2/show/ NCT00789828	[19]
Эверолимус Everolimus	TSC1, TSC2	СЭГА SEGA	Нет данных No data	28	52,2 % – уменьшение размеров опухоли ≥50 % 60,9 % – уменьшение размеров опухоли ≥30 % 52,2 % – decrease of tumor size ≥50 % 60,9 % – decrease of tumor size ≥30 %	I–II степень токсичности у 100 %; инфекции верхних дыхательных путей, стоматит III степень токсичности: 50 % – целлюлит, пневмония, синусит, стоматит Grade I–II toxicity – 100 %; infections of the upper respiratory tract, stomatitis Grade III toxicity: 50 % cellulitis, pneumonia, sinusitis, stomatitis	II	NCT 00411619	https:// clinicaltrials. gov/ct2/show/ NCT00411619	[20]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Препарат/ комбинация препаратов Medicine/ combination of medicine	Молекуляр- ная мишень Molecul target	Тип ГНСЗ type of LGG	Молекулярно- генетические характе- ристики опухолей Molecular-genetic feature of the tumors	Число больных в исследо- ваниях Number of patients in the study	Ответ на лечение Response to treatment	Побочные эффекты Side effects	Фаза КИ Phase of CT	Номер КИ Number of CT	Ссылка на КИ Reference to CT	Ссылка Reference
Эверолимус Everolimus	TSC1, TSC2	ГНСЗ с/без НФ-1 LGG with/ without NF-1	Нет данных No data	23	4 – ЧО 13 – СЗ 6 – ПР 4 – PR 13 – SD 6 – PD	I–II степень токсичности: стоматит Grade I–II toxicity: stomatitis	II	NCT 01158651	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01158651	[21]
Рапамицин + эрлотиниб Rapamycin+ erlotinib	TSC1, TSC2/EGFR	ПА, ФА PA, FA	Нет данных No data	19	2 – СЗ 10 – ПР 7 – исключе- ны из КИ 2 – SD 10 – PD 7 – excluded from the study	III степень токсичности: 1 – целлюлит 1 – нейтропения I–II степень токсичности: 11 – сыпь 9 – стоматит 7 – мукозит 2 – паронихии по 1 – нейтропения, гипертриглицеридемия, гиперхолестеролемия Grade III toxicity: 1 – cellulitis 1 – neutropenia Grade I–II toxicity: 11 – rash 9 – stomatitis 7 – mucositis 2 – paronychia by 1 – neutropenia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia	I/II	NCT 00901849	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00901849	[22]
Бевацизумаб Bevacizumab	VEGFR	ПА, ПМА, ФА PA, PMA, FA	Нет данных No data	14	12 – ЧО 2 – СЗ 12 – PR 2 – SD	I–II степень токсичности: протеинурия, головная боль Grade I–II toxicity: proteinuria, headache	II	NCT 00381797	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00381797	[23]
Седираниб Cediranib	VEGFR	ПА PA	Нет данных No data	36 (из них 5 с ГНСЗ) 36 (5 with LGG)	Нет данных No data	Исследование остано- влено из-за чрезмерной токсичности The study was stopped due to excessive toxicity	I	NCT 00326664	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00326664	[24]

Окончание таблицы
End of table

Препарат/ комбинация препаратов Medicine/ combination of medicine	Молекуляр- ная мишень Molecul target	Тип ГНСЗ type of LGG	Молекулярно- генетические характе- ристики опухолей Molecular-genetic feature of the tumors	Число больных в исследо- ваниях Number of patients in the study	Ответ на лечение Response to treatment	Побочные эффекты Side effects	Фаза КИ Phase of CT	Номер КИ Number of CT	Ссылка на КИ Reference to CT	Ссылка Reference
Винбластин + нилотиниб Vinblastine + nilotinib	PDGFR, с-KIT BCR/ABL	ГНСЗ без НФ-1 LGG without NF-1	Нет данных No data	35	7 – ЧО 18 – ПР 7 – PR 18 – PD	IV степень токсичности: 3 – гематологическая токсичность; 2 – кожная токсичность; 1 – феб- рильная нейтропения Grade IV toxicity: 3 – hematological toxicity 2 – skin toxicity 1 – febrile neutropenia	I	NCT 01887522	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01887522	[25]
Сунитиниб Sunitinib	PDGFR; VEGFR, с-KIT	ГГ GG	Нет данных No data	23 (из них 1 с ГНСЗ) 23 (1 with LGG)	1 – СЗ 1 – SD	I–III степень токсично- сти: гематологическая токсичность, усталость, сердечная токсичность Grade I–III toxicity: hematological toxicity, fatigue, heart toxicity	I	NCT 00387920	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00387920	[26]
Сорафениб Sorafenib	BRAFV6000, PDGFR, VEGFR, с-KIT	ПА, ГГ, ФА PA, GG, FA	5 пациентов – сли- ние BRAF:K1A1549 5 patients with BRAF:K1A1549 fusion	12	9 – ПР 9 – PD	I–II степень токсичности: сыпь, сухость кожи, увеличение уровня АЛТ/АСТ; III степень токсичности: 1 – диарея 1 – головная боль 1 – мукозит Grade I–II toxicity: rash, dryness of skin, ALT/AST increasing; grade III toxicity: 1 – diarrhea 1 – headache 1 – mucositis	II	NCT 01338857	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01338857	[27]

Примечание. КИ – клиническое исследование; ГНСЗ – глиома низкой степени злокачественности; ПА – пилоидная астроцитиома; ГГ – ганглиоглиома; ПКА – плеоморфная ксантоастроцитиома; ОДП – олигодендроглиома; ЧО – частичный ответ; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ПР – продолженный рост; ПО – полный ответ; СЗ – стабилизация заболевания; СЭГА – субэпендимальная гигантоклеточная астроцитиома; НФ-1 – нейрофиброматоз 1-го типа; ФА – фибриллярная астроцитиома; ПМА – пиломиксоидная астроцитиома.

Note. CT – clinical trial; LGG – low grade glioma; PA – pilocytic astrocytoma; GG – ganglioglioma; PXA – pleomorphic xanthoastrocytoma; ODG – oligodendroglioma; PR – partial response; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; PD – progression of disease; CR – complete response; SD – stable disease; SEGA – subependymal giant cell astrocytomas; NF-1 – neurofibromatosis of 1 type; FA – fibrillar astrocytoma; PMA – pilomyxoid astrocytoma.

апоптоз. Имеется успешный опыт лечения траметинибом детей с рецидивирующими/рефрактерными ПА с наличием слияния генов *BRAF:K1A1549*. С. Miller и соавт. описали 2 случая у детей с неоперабельной, резистентной к химиотерапии ПА с уменьшением объема опухоли от 55,9 до 65,5 % после 1,5 года терапии [28]. L. Wagner и соавт. описали уменьшение размеров опухоли, нормализацию массы тела и физического развития у ребенка с диэнцефальной кахексией и продолженным ростом глиомы зрительного пути после 2 линий цитостатической терапии после 18 мес лечения траметинибом [29]. М. Kondyli и соавт. опубликовали серию наблюдений за состоянием 6 пациентов с глиомами зрительного пути с рефрактерными к химиотерапии ПА, — в 5 опухолях обнаружено слияние *BRAF:K1A1549* и в 1 случае — мутации в *FGFR1/NF1/PTPN11*. У 5 пациентов зарегистрирован большой или малый частичный ответ [30]. Т. Knight и соавт. описали практически полную регрессию рефрактерной к химиотерапии диффузной астроцитомы (II степени злокачественности) через 3 мес лечения траметинибом у пациента с НФ-1 [31].

На данный момент завершено КИ траметиниба как в монотерапии у детей с различными опухолями, в том числе с ГНСЗ, так и в сочетании с дабрафенибом при опухолях с доказанной мутацией *BRAF* I и II фазы (ClinicalTrials.gov идентификатор NCT02124772). Результаты пока не опубликованы.

МЕК-ингибиторы в текущих КИ I и II фазы показали свой потенциал и рассматриваются для применения в одном из рукавов рандомизации в предстоящем КИ III фазы.

Несколько реже при ГНСЗ у детей встречаются точечные мутации гена *BRAF*. Наиболее часто сообщается о мутации *BRAFV600E*, приводящей к замещению валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 *BRAF*. В исследовании, посвященном анализу наличия мутаций *BRAFV600E* в 1320 опухолях центральной нервной системы, эта мутация была идентифицирована у 9 % пациентов с ПА [32]. Следует отметить, что частота ее встречаемости выше при других подтипах ГНСЗ, особенно при плеоморфных ксантоастроцитах (66–70 %) и ганглиоглиомах (50 %) [32–34].

BRAF-ингибиторы

Механизм действия — селективное ингибирование *BRAF* серин-треониновой киназы. *BRAF* является компонентом MAPK-сигнального пути, параллельно с *ARAF* и *CRAF*. Подавляющее большинство мутаций *BRAF* обеспечивает конституциональную активацию киназы таким образом, что ее активность повышается в несколько сотен раз по сравнению с *BRAF* дикого типа. Это способствует RAS-независимой клеточной пролиферации и клоногенному росту. Терапевтическая роль *BRAF*-ингибиторов была установлена только в опухолевых клетках с наличием мутаций в гене *BRAF V600*.

Вемурафениб — обратимый конкурентный АТФ-ингибитор киназного домена *BRAF* с активирующей мутацией в кодоне V600E. Вемурафениб в настоящее время представляет собой стандарт лечения пациентов с метастатической меланомой с мутацией *BRAFV600E*. Опыт применения вемурафениба при ГНСЗ у детей начался с успешного лечения 13-летней девочки с ганглиоглиомой ствола головного мозга с мутацией *BRAFV600E* [35]. Положительный опыт лечения вемурафенибом *BRAFV600E*-мутированной ганглиоглиомы у ребенка был подтвержден другими исследователями [36]. Вемурафениб был исследован в монотерапии у 6 детей с глиомами с мутацией *BRAFV600E* (2 ганглиоглиомы, 1 плеоморфная ксантоастроцитома, 1 ганглионейроцитома и 2 злокачественные глиомы). Медиана возраста при постановке диагноза составила 54 мес (от 1 до 108 мес). У обоих пациентов с ганглиоглиомой, у пациента с плеоморфной ксантоастроцитомой и у 1 пациента со злокачественной глиомой зарегистрирован положительный ответ со стороны опухоли в течение первых 6 мес [37]. F. del Bufalo и соавт. сообщили об опыте использования вемурафениба у 7 детей с ГНСЗ срединной локализации, в том числе продолговатого, среднего мозга, цервикомедулярной локализации. Из них 6 пациентам вемурафениб был назначен в 1-й линии. Полного и частичного ответа достигли 4 пациента, у 1 зарегистрировано прогрессирование заболевания, оставшиеся продолжают лечение [38]. При более редких младенческих ГНСЗ вемурафениб также продемонстрировал свою эффективность. Z. Pavelka и соавт. сообщили об опыте лечения вемурафенибом 11-месячной девочки с метастатической десмопластической инфантильной астроцитомой/ганглиоглиомой. По завершении 6 мес терапии были зафиксированы частичный эффект по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) и улучшение клинической симптоматики [39].

Сочетание винбластина с вемурафенибом показало свою эффективность у 2-летнего ребенка с рецидивирующей пиломиксоидной астроцитомой после 3 линий полихимиотерапии. Лечение винбластином с вемурафенибом длилось 12 мес, далее ребенок получал монотерапию вемурафенибом. На 15-м месяце терапии по данным МРТ документирован полный ответ со стороны опухоли [40]. Недавно была завершена I фаза КИ безопасности и эффективности применения вемурафениба при рецидивных и рефрактерных ГНСЗ с мутацией *BRAFV600E* у детей (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01748149). В исследование вошли 19 пациентов. Рекомендуемая доза для II фазы КИ для детей до 18 лет составила 550 мг/м² [17]. В настоящее время проходит II фаза КИ.

Дабрафениб — обратимый конкурентный АТФ-ингибитор, который избирательно ингибирует киназу *BRAFV600*. В I фазе исследования дабрафениба у детей с рецидивирующими или рефрактерными солидными опухолями из 15 детей с ГНСЗ при применении

дабрафениба у 8 зафиксирован частичный ответ, у 6 — стабилизация процесса [18]. Эффективность дабрафениба описана также у 2-месячного ребенка с ПА с мутацией BRAFV600E. По данным MPT через 2 мес была выявлена 71 % циторедукция опухоли в режиме T2/FLAIR, в процессе лечения зафиксировано дальнейшее уменьшение опухоли. Важно отметить, что, кроме умеренной экземы, побочных эффектов не наблюдалось [41]. На данный момент проходят I и II фазы международного исследования по изучению применения дабрафениба у детей с солидными опухолями с наличием мутации BRAFV600E, включая ГНСЗ (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01677741).

Несмотря на впечатляющие результаты лечения, к ингибиторам BRAF развивается резистентность [42]. На основании этого проводится попытка ингибирования пути MAPK в двух направлениях, а не в одном, что уменьшает риск прогрессирования заболевания и, следовательно, замедляет возникновение резистентности. Как уже упоминалось, MEK-ингибитор траметиниб в комбинации с дабрафенибом проходит различные I и II фазы при глиомах с мутацией BRAF у детей (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT02124772).

Ингибиторы мишени рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR)

Другой сигнальный каскад, связанный с тирозинкиназой, вовлеченной в патогенез ГНСЗ у детей, представляет собой PI3K/mTOR, который регулирует рост клеток, синтез белков и апоптоз [43]. Одной из ГНСЗ, связанных с активацией mTOR, является субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома (СЭГА) у пациентов с туберозным склерозом, которая развивается в 15–20 % случаев, опухоли обычно располагаются рядом с отверстием Монро, вызывая обструктивную гидроцефалию. Исторически хирургическая резекция была единственным методом лечения СЭГА, поскольку эти опухоли были устойчивы к цитостатической терапии, которая применялась для лечения других ГНСЗ, и лучевой терапии [44]. Тем не менее хирургическая резекция не могла полностью предотвратить риск продолженного роста или рецидива опухоли. Благодаря применению ингибиторов mTOR успешное патогенетическое лечение СЭГА стало достижимым. Эта эволюция, которая произошла в лечении данных опухолей, к настоящему времени представляет собой наиболее значительный прогресс молекулярной таргетной терапии в лечении детских ГНСЗ [45, 46].

mTOR-ингибиторы

Рапамицин — натуральный продукт, выделенный из экстрактов почвенных бактерий, найденных на острове Пасхи, который также известен под своим родным названием Rapa Nui. В 1964 г. канадская научная экспедиция отправилась на остров Пасхи, чтобы собрать образцы растений и грунта, из которых они выделили и очистили активный метаболит с антибиотическими

свойствами, известный как рапамицин-бактерии *Streptomyces hygroscopicus* [47]. Было продемонстрировано, что у рапамицина имеется сильная противогрибковая активность [48]. Спустя 2 года после выделения и характеристики рапамицина обнаружили его цитостатическую активность в иммунных клетках [49], а 5 лет спустя — в опухолевых клетках человека, включая медуллобластому и глиому [50]. У рапамицина также была определена иммунодепрессивная активность, показано, что он эффективен в предотвращении отторжения аллотрансплантата [51]. Антипролиферативные эффекты у дрожжей и лимфоцитов привели к исследованиям рапамицина на линиях опухолевых клеток детской рабдомиосаркомы [52]. Впоследствии начали исследование рапамицина (сиролимуса) и разработку новых агентов (темсиролимуса, эверолимуса и ридафоролимуса).

Механизм действия рапамицина до конца не раскрыт. Его начали исследовать с использованием *Saccharomyces cerevisiae*. Рапамицин связывал иммуофилин FK506-связывающий белок (FKBP) и останавливал дрожжи в G1-фазе клеточного цикла. Важно отметить, что были идентифицированы 2 гена-мишени рапамицина — TOR1 и TOR2, и было предположено их взаимодействие в комплексе с рапамицином [53]. В клетках млекопитающих TOR существует как одна изоформа в 289 кДа (mTOR), которая специфически связывается с FKBP12 [54]. Тройная кристаллическая структура была открыта в 1996 г. Было показано, как рапамицин опосредует димеризацию FKBP12 с mTOR [55], которая затем блокирует доступ к активному сайту mTOR-киназы, расположенному в углублении и гидрофобном кармане за FKBP12, связывающим домен рапамицина [56]. Таким образом, рапамицин непосредственно не связывается с белком mTOR. Скорее это высокоселективное связывание рапамицина с FKBP12 и последующее селективное связывание комплекса FKBP12-рапамицин с mTORC1, который передает высокочувствительное и направленное ингибирование mTORC1.

Сириликус/рапамицин — первый фармакологический агент из класса ингибиторов mTORC1, который был разработан и одобрен в 1999 г. Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) для предотвращения отторжения трансплантата у пациентов с трансплантацией почки [57]. Первое сообщение об эффективности перорального ингибитора mTOR при СЭГА, ассоциированных с туберозным склерозом, было в 2006 г. У 5 пациентов с СЭГА наблюдалась регрессия опухоли в среднем на 65 % после введения иммунодепрессанта сириликуса (рапамицина) [45]. Сириликус, хоть и не одобрен у пациентов с туберозным склерозом, но подвергся серьезным исследованиям различных аспектов для лечения заболевания [58, 59].

Эверолимус на сегодняшний день является единственным ингибитором mTOR, который одобрен FDA для лечения СЭГА при туберозном склерозе, после

того как результаты 2 КИ продемонстрировали его эффективность и безопасность [19, 20]. Включен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [60, 61]. Первым было исследование 28 пациентов старше 3 лет с туберозным склерозом и прогрессирующими СЭГА по данным МРТ до начала лечения. У всех 28 человек зарегистрировано уменьшение объема опухоли или снижение роста. В целом почти у 80 % больных СЭГА уменьшилась на 1/3, и более чем у 30 % пациентов СЭГА уменьшилась на 50 % в течение 6 мес [20]. Этот эффект был подтвержден в ходе рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования 117 пациентов, у которых эверолимус был проанализирован в сравнении с плацебо. У трети пациентов, получавших эверолимус, было продемонстрировано уменьшение объемов СЭГА на ≥ 50 % по сравнению с группой больных, принимавших плацебо. Как и в предыдущих исследованиях, повторный рост опухоли происходил при прекращении терапии ингибитором mTOR, но повторное лечение показало свою эффективность. Эверолимус также был эффективен при других проявлениях туберозного склероза [19].

Ингибиторы mTOR применимы не только для СЭГА, ассоциированных с туберозным склерозом. У них имеется потенциальная активность и при других детских ГНСЗ. При НФ-1, ассоциированных с ГНСЗ, имеются различные уровни активации mTOR [62, 63], а ПА, в частности, демонстрируют значительно повышенную передачу сигналов mTOR [62].

В настоящее время несколько КИ проверяют ингибиторы mTOR при спорадических и НФ-1-ассоциированных педиатрических ГНСЗ. Эверолимус продемонстрировал обнадеживающие результаты в проспективном исследовании II фазы у 23 детей со спорадическими рецидивирующими ГНСЗ. Частичный ответ зафиксирован у 4 детей, стабилизация заболевания — у 13 [21]. В настоящее время продолжается оценка эверолимуса НФ-1-ассоциированных детских ГНСЗ (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01158651). В другом исследовании I и II фазы рапамицин использовали в комбинации с ингибитором рецептора эпителиального фактора роста (EGFR) эрлотинибом у 19 детей с рецидивирующими ГНСЗ, у 8 из которых был НФ-1. Несмотря на то что комбинация хорошо переносилась, частота ответа оказывалась неудовлетворительной: только у 2 пациентов с НФ-1 отмечена стабилизация заболевания >18 мес после завершения лечения [22]. Эти результаты показывают, что выявление молекулярных предикторов ответа на таргетные препараты будет не менее важным, чем оценка самих агентов. Важно понять, коррелирует ли увеличение экспрессии mTORC1 или mTORC2 с ответом на ингибиторы mTOR, так как они главным образом ингибируют mTORC1 [64].

Недавно разработано 2-е поколение ингибиторов mTOR (ингибиторы киназы mTOR, или TORКинибы). В качестве основного отличия от аналогов рапамицина

они способны непосредственно ингибировать киназу, блокируя каталитический сайт АТФ, вместо связывания FKBP12, — тем самым происходит ингибирование как mTORC1, так и mTORC2 [65, 66]. Двойные ингибиторы киназы TORC1/TORC2 могут быть перспективными препаратами для лечения агрессивных ГНСЗ.

Ингибиторы тирозинкиназы

Тирозинкиназа — особый фермент из подкласса протеинкиназ, она катализирует транспортировку фосфатного остатка от АТФ на тирозиновый остаток специфических клеточных белков-мишеней.

Рецепторные тирозинкиназы, такие как рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), EGFR и рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR), являются восходящими членами как сигнального пути BRAF/MAPK, так и PI3K/mTOR (см. рисунок). Они функционируют как трансмембранные регуляторы ключевых клеточных процессов — пролиферации, дифференцировки и обмена веществ [67], а также играют решающую роль в ангиогенном сигналинге опухоли, делая их значимыми терапевтическими мишенями для ингибирования. Современные новые агенты, используемые в этом контексте, являются либо моноклональными антителами, направленными против лигандов фактора роста, либо ингибиторами, непосредственно направленными на домен тирозинкиназы.

Ингибиторы тирозинкиназных рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептор VEGFR играют важную роль не только в физиологическом, но и в патологическом ангиогенезе. VEGF принадлежит семейству супергенов плацентарного фактора роста (PDGF). В настоящее время выделяют 6 типов VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PLGF и 3 типа VEGFR: VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. VEGF-A регулирует ангиогенез и сосудистую проницаемость, активируя 2 рецептора: VEGFR-1 и -2. С другой стороны, VEGF-C/VEGF-D и их рецептор VEGFR-3 главным образом регулируют лимфангиогенез. VEGFR отдаленно связаны с семейством PDGFR, которые сильно стимулируют путь PI3K-Akt к пролиферации клеток, VEGFR-2 — основной сигнал-преобразователь для ангиогенеза, использует путь PLC γ -PKC-MAPK для передачи сигнала. Система VEGF — VEGFR является важной мишенью для антиангиогенной терапии опухолей [68].

Бевацизумаб — моноклональное антитело, действующее против VEGF. Для рефрактерных ГНСЗ у детей он является наиболее изученным препаратом [23]. Во многих описанных случаях его использовали в сочетании с ингибитором топоизомеразы I иринотеканом. Исследование бевацизумаба и иринотекана у 7 детей с рефрактерными ГНСЗ показало уменьшение объема

опухоли в 6 (86 %) случаях. Профиль токсичности оставался приемлемым, причем наиболее частым нежелательным эффектом была протеинурия I степени [69]. В исследовании II фазы у 14 детей с ГНСЗ оценивали терапию на основе бевацизумаба при рецидиве и продолженном росте опухоли. Медиана лечения составила 12 мес (1–24 мес). У 12 пациентов зарегистрирован объективный ответ, у 2 — стабилизация заболевания. Медиана времени до максимального уменьшения опухоли составляла 9 нед (7–17 нед). Ни у одного пациента не отмечено прогрессирования заболевания во время лечения, хотя 13 из 14 больных имели прогрессирование после завершения лечения бевацизумабом в среднем через 5 мес. Четыре пациента вновь получили бевацизумаб — у всех отмечен положительный эффект [23]. Сокращенный период наблюдения в упомянутых исследованиях ограничивал какой-либо анализ безрецидивной выживаемости. Для решения этой проблемы была инициирована II фаза исследования бевацизумаба и иринотекана у 35 детей с рефрактерными ГНСЗ. Несмотря на то что режим относительно хорошо переносился и стабилизация заболевания после 6 мес лечения зафиксирована у 80 % пациентов, только у 2 больных отмечен объективный ответ на терапию, 2-летняя безрецидивная выживаемость составила 48 %.

Седираниб — ингибитор тирозинкиназных рецепторов VEGF. На сегодняшний день завершена I фаза КИ AZD-2171 в лечении детей с рецидивирующими, прогрессирующими или рефрактерными первичными опухолями центральной нервной системы, в исследование вошли 5 детей с ПА (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT00326664) [24].

Ингибиторы тирозинкиназных рецепторов тромбоцитарного фактора роста

Тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor, PDGF) — один из митогенных полипептидов, который состоит из 2 цепей, объединенных между собой AA, BB и AB. Есть 5 различных субъединиц PDGF: PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD и гетеродимер AB. Только димерные формы PDGF могут связываться с рецепторами. Известны 2 типа PDGFR: α и β . PDGFR относится к рецепторам с тирозинкиназной активностью. PDGFR (α и β) взаимодействуют с различными субъединицами PDGF (A, B и C), образуют аутокринные и паракринные стимуляционные петли между опухолевыми клетками и кровеносными сосудами, и поэтому важны для роста опухоли и ангиогенеза [70]. Блокирование PDGFR может ингибировать пути PI3K/mTOR и MAPK и обладает противоопухолевой активностью.

Иматиниба мезилат — это тирозинкиназный ингибитор PDGFR, c-KIT и BCR-ABL. Описан значительный регресс диссеминированной ПА у ребенка при прогрессировании заболевания после лечения иматинибом. При иммуногистохимическом анализе в эндотелиальных клетках опухолевых капилляров выявлена экспрессия PDGFR- α и PDGFR- β [71]. Другие авторы

описали стабилизацию заболевания у 6 детей с прогрессирующими ГНСЗ после нескольких операций и нескольких линий полихимиотерапии при использовании иматиниба. Иммуногистохимия в эндотелиальных клетках опухолевых капилляров у всех 6 пациентов выявила экспрессию PDGFR- α и PDGFR- β [72].

Нилотиниб — тирозинкиназный ингибитор PDGFR, c-KIT и BCR-ABL. Недавно завершилась I фаза КИ нилотиниба в сочетании с винбластином. В исследование вошли 35 детей с ГНСЗ, из них у 10 (29 %) был НФ-1. Медиана возраста составила 7 лет (1–19 лет). В ходе наблюдений оценивали 4 дозы сочетания винбластина и нилотиниба: 3 мг/м² + 115 мг/м², 3 мг/м² + 230 мг/м², 4 мг/м² + 230 мг/м² и 3 мг/м² + 350 мг/м². Рекомендуемая доза для II фазы КИ составила 3 мг/м² + 230 мг/м². У 7 пациентов был зарегистрирован частичный радиологический ответ (ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01887522).

Сунитиниб — тирозинкиназный ингибитор, основной мишенью которого являются PDGFR α и β . Кроме того, он ингибирует VEGFR-1, -2 и -3, KIT-рецепторы фактора стволовых клеток, рецепторы Fms-подобной тирозинкиназы-3 (FLT-3), рецепторы колониестимулирующего фактора (CSF-1R), рецепторы нейротрофического глиального фактора (RET). Сунитиниб в дозах 20 мг/м² и 15 мг/м² применялся в I фазе КИ при солидных опухолях у детей, и, хотя дозозависимая сердечная токсичность препятствовала его широкому использованию, он привел к стабилизации заболевания у 1 ребенка с ганглиоглиомой [26]. Во II фазе КИ при злокачественных глиомах и эпендимомах у детей сунитиниб в дозе 15 мг/м² 1 раз в день в течение 4 нед с 2-недельным перерывом показал хорошую переносимость. Для оценки эффективности данного препарата, в том числе при ГНСЗ у детей, необходимы дальнейшие КИ [73].

Ингибиторы тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста

Эпидермальный фактор роста (EGF) — глобулярный белок с высокой митогенной активностью. Известны 4 трансмембранных рецептора EGFR, имеющих тирозинкиназную активность: ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4. Эпидермальный фактор роста связывается с рецептором EGF на поверхности клеток, после чего стимулирует активность внутриклеточных тирозинкиназ. Далее каскад может пойти разными путями — через Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR. В итоге это приводит к пролиферации, ангиогенезу, снижению апоптоза, инвазии.

Эрлотиниб — ингибитор тирозинкиназы EGFR. Как уже указывалось ранее, эрлотиниб был исследован вместе с рапамицином в I и II фазах КИ у детей с рецидивирующими ГНСЗ и не продемонстрировал эффективности [22]. Несмотря на удовлетворительную переносимость, применение эрлотиниба у данной группы пациентов ограничено.

Мультикиназные ингибиторы

Сорафениб является низкомолекулярным мультикиназным ингибитором. Он подавляет BRAF, VEGFR, PDGFR и c-KIT. В исследовании II фазы сорафениба, куда вошли 12 детей с рецидивирующими высокодифференцированными астроцитомами, в том числе со слиянием BRAF:K1A1549 у 3 пациентов, наблюдалась высокая частота прогрессирования, указывающая на парадоксальную активацию сигнального пути ERK, из-за взаимодействий между лекарственным средством и димеризацией между мутантным и диким типом BRAF/CRAF. Ингибиторы *RAF* подавляют ERK-сигналинг в клетках с мутантным BRAF/CRAF, но усиливают сигналинг в клетках с BRAF/CRAF дикого типа, приводя к росту опухоли [27, 74].

Заключение

За прошедшее десятилетие понимание патогенеза ГНСЗ у детей значительно улучшилось. Обязательное молекулярно-генетическое исследование ткани опухоли, в особенности определение aberrаций, связанных с геном *BRAF*, является важной частью диагностических мероприятий, позволяющих определить тактику терапии пациентов, так как ответ на различные режи-

мы лечения, включая таргетную терапию, в большинстве случаев зависит от результатов проведенного анализа. С учетом того, что в основе молекулярного патогенеза большинства ГНСЗ лежит активация сигнальных путей MAPK и mTOR, наиболее перспективными препаратами являются BRAF-ингибиторы с наличием или без MEK-ингибиторов у пациентов с точечной мутацией в гене *BRAFV600E*, MEK-ингибиторы у пациентов со слиянием BRAF:K1A1549, mTOR-ингибиторы у пациентов с мутацией в генах *mTORC1* и *mTORC2*. У этих гистологически и молекулярно-генетически гетерогенных опухолей высокие показатели общей выживаемости, и, несомненно, при принятии решения, касающегося любого вида лечения, следует учитывать отдаленные результаты лечения, профили токсичности, любое воздействие, включая таргетную терапию, на нормальное развитие детского организма. Если для одного гистологического варианта ГНСЗ, такого как СЭГА, таргетные препараты уже вошли в рутинную практику, то для остальных гистологических вариантов еще предстоит выяснить, следует ли интегрировать таргетную терапию для лечения вновь диагностированных пациентов и может ли она заменить стандартную цитостатическую терапию.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol* 2014;16(Suppl 4):iv1–63. DOI: 10.1093/neuonc/nou223.
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131(6):803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Gnekow A.K., Falkenstein F., von Hornstein S. et al. Long-term follow-up of the multicenter, multidisciplinary treatment study HIT-LGG-1996 for low-grade glioma in children and adolescents of the German Speaking Society of Pediatric Oncology and Hematology. *Neuro Oncol* 2012;14(10):1265–84. DOI: 10.1093/neuonc/nos202.
- Robinson K.E., Fraley C.E., Pearson M.M. et al. Neurocognitive late effects of pediatric brain tumors of the posterior fossa: a quantitative review. *J Int Neuropsychol Soc* 2013;19(1):44–53. DOI: 10.1017/S1355617712000987.
- Jones D.T.W., Kocalkowski S., Liu L. et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic *BRAF* fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* 2008;68(21):8673–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2097.
- Pfister S., Janzarik W.G., Remke M. et al. *BRAF* gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* 2008;118(5):1739–49. DOI: 10.1172/JCI33656DS1.
- Collins V.P., Jones D.T.W., Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 2015;129(6):775–88. DOI: 10.1007/s00401-015-1410-7.
- Northcott P.A., Pfister S.M., Jones D.T.W. et al. Next-generation(epi)genetic drivers of childhood brain tumours and the outlook for targeted therapies. *Lancet Oncol* 2015;16:293–302. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71206-9.
- Zhang J., Wu G., Miller C.P. et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 2013;45(6):602–12. DOI: 10.1038/ng.2611.
- Jacob K., Albrecht S., Sollier C. et al. Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br J Cancer* 2009;101(4):722–33. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605179.
- Hawkins C., Walker E., Mohamed N. et al. BRAF-K1A1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(14):4790–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0034.
- Arun D., Gutmann D.H. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2004;17(2):101–5.
- Akinleye A., Furqan M., Mukhi N. et al. MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 2013;6(1):27. DOI: 10.1186/1756-8722-6-27.
- Владимирова Л.Ю. MEK как терапевтическая мишень в онкологии. Злокачественные опухоли 2015;16(4):20–7. DOI: 10.18027/2224-5057-2015-4s2-20-27. [Vladimirova L.Yu. MEK as a therapeutic target in oncology. Malignant tumors 2015;16(4):20–7. (In Russ.)].
- Banerjee A., Jakacki R.I., Onar-Thomas A. et al. A phase I trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC) study. *Neuro Oncol* 2017;19(8):1135–44. DOI: 10.1093/neuonc/now282.
- Bouffet E., Kieran M., Hargrave D. et al. Trametinib therapy in pediatric patients with low-grade gliomas (LGG) with *BRAF* gene fusion; a disease-specific cohort in the first pediatric testing of trametinib. *Neuro Oncol* 2018;20(Suppl 2):i114. DOI: 10.1093/neuonc/now059.387.
- Nicolaides T., Nazemi K., Crawford J. et al. A safety study of vemurafenib, an oral inhibitor of BRAFV600E, in children with recurrent/refractory BRAFV600E mutant brain tumor: PNOC-002. *Neuro Oncol* 2017;19(Suppl 6):vi188. DOI: 10.1093/neuonc/now168.761.
- Kieran M.W., Hargrave D.R., Cohen K.J. et al. Phase I study of dabrafenib in pediatric

- patients (pts) with relapsed or refractory BRAFV600E high- and low-grade gliomas (HGG, LGG), Langerhans cell histiocytosis (LCH), and other solid tumors (OST). *J Clin Oncol* 2015;33(Suppl 15).
19. Franz D.N., Belousova E., Sparagana S. et al. Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2013;381(9861):125–32. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61134-9.
 20. Franz D.N., Agricola K., Mays M. et al. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma: 5-year final analysis. *Ann Neurol* 2015;78(6):929–38. DOI: 10.1002/ana.24523.
 21. Kieran M., Yao X., Macy M. et al. A prospective multi-institutional phase II study of everolimus (Rad001), an mTOR inhibitor, in pediatric patients with recurrent or progressive low-grade glioma. A poetic consortium trial. *Pediatr Blood Cancer* 2013;(60):19.
 22. Yalon M., Rood B., MacDonald T. et al. A feasibility and efficacy study of rapamycin and erlotinib for recurrent pediatric low-grade glioma (LGG). *Pediatr Blood Cancer* 2013;(60):71–6. DOI: 10.1002/pbc.24142.
 23. Hwang E.I., Jakacki R.I., Fisher M.J. et al. Long-term efficacy and toxicity of bevacizumab-based therapy in children with recurrent low-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(5):776–82. DOI: 10.1002/pbc.24297.
 24. Kieran M.W., Chi S., Goldman S. et al. A phase I trial and PK study of cediranib (AZD2171), an orally bioavailable pan-VEGFR inhibitor, in children with recurrent or refractory primary CNS tumors. *Childs Nerv Syst* 2015;31(9):1433–45. DOI: 10.1007/s00381-015-2812-5.
 25. Grill J., Le Deley M.S., Le Teuff G. et al. Dose-finding study of vinblastine in combination with nilotinib in children, adolescents and young adults with refractory or recurrent low-grade glioma: results of the ITCC/SIOPE-Brain VINILO phase I trial (NCT01887522). *J Clin Oncology* 2016; 34(Suppl 15):10555. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.10555.
 26. DuBois S.G., Shusterman S., Ingle A.M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of sunitinib in pediatric patients with refractory solid tumors: a children's oncology group study. *Clin Cancer Res* 2011;17(15):5113–22. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0237.
 27. Karajannis M.A., Legault G., Fisher M.J. et al. Phase II study of sorafenib in children with recurrent or progressive low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol* 2014;16(10):1408–16. DOI: 10.1093/neuonc/nou059.
 28. Miller C., Guillaume D., Dusenbery K. et al. Report of effective trametinib therapy in 2 children with progressive hypothalamic optic pathway pilocytic astrocytoma: documentation of volumetric response. *J Neurosurg Pediatr* 2017;19(3):1–6. DOI: 10.3171/2016.9.PEDS16328.
 29. Wagner L.M., Myseros J.S., Lukins D.E. et al. Targeted therapy for infants with diencephalic syndrome: a case report and review of management strategies. *Pediatr Blood Cancer* 2018;65(5):e26917. DOI: 10.1002/pbc.26917.
 30. Kondyli M., Larouche V., Saint-Martin C. et al. Trametinib for progressive pediatric low-grade gliomas. *J Neurooncol* 2018; 140(2):435–44. DOI: 10.1007/s11060-018-2971-9.
 31. Knight T., Shatara M., Carvalho L. et al. Dramatic response to trametinib in a male child with neurofibromatosis type 1 and refractory astrocytoma. *Pediatr Blood Cancer* 2019;66(10):e27474. DOI: 10.1002/pbc.27474.
 32. Schindler G., Capper D., Meyer J. et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011;121(3):397–405. DOI: 10.1007/s00401-011-0802-6.
 33. Dias-Santagata D., Lam Q., Vernovsky K. et al. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One* 2011;6(3):e17948. DOI: 10.1371/journal.pone.0017948.
 34. Dougherty M.J., Santi M., Brose M.S. et al. Activating mutations in *BRAF* characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2010;12(7):621–30. DOI: 10.1093/neuonc/nuq007.
 35. Rush S., Foreman N., Liu A. Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol* 2013;31(10):159–60. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.1568.
 36. Del Bufalo F., Carai A., Figà-Talamanca L. et al. Response of recurrent BRAFV600E mutated ganglioglioma to Vemurafenib as single agent. *J Transl Med* 2014;12:356. DOI: 10.1186/s12967-014-0356-1.
 37. Bufalo F., Cacchione A., Carai A. et al. BRAFv600E inhibitor (Vemurafenib) in pediatric patients affected by BRAFv6000E mutated gliomas. *Neuro Oncol* 2016;18(Suppl 3):iii24. DOI: 10.1093/neuonc/now069.04.
 38. Del Bufalo F., Ceglie G., Cacchione A. et al. BRAFV600E inhibitor (vemurafenib) for BRAF V600E mutated low grade gliomas. *Front Oncol* 2018;8:526. DOI: 10.3389/fonc.2018.00526.
 39. Pavelka Z., Berkovcova J., Skotakova J. et al. Objective response to Vemurafenib in a child treated for metastatic desmoplastic infantile astrocytoma. *Neuro Oncol* 2016;18(Suppl 3):iii92. DOI: 10.1093/neuonc/now075.60.
 40. Skrypek M., Foreman N., Guillaume D., Moertel C. Pilocytic astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(11):2099–100. DOI: 10.1002/pbc.25084.
 41. Lassaletta A., Guerreiro Stucklin A., Ramaswamy V. et al. Profound clinical and radiological response to BRAF inhibition in a 2-month-old diencephalic child with hypothalamic/chiasmatic glioma. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63(11):2038–41. DOI: 10.1002/pbc.26086.
 42. Rizos H., Menzies A.M., Pupo G.M. et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res* 2014;20(7):1965–77. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3122.
 43. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H. et al. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 2012;3(9):954–87. DOI: 10.18632/oncotarget.652.
 44. Lam C., Bouffet E., Tabori U. et al. Rapamycin (sirolimus) in tuberous sclerosis associated pediatric central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54(3):476–9. DOI: 10.1002/pbc.22298.
 45. Franz D.N., Leonard J., Tudor C. et al. Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 2006;59(3):490–8. DOI: 10.1002/ana.20784.
 46. Krueger D.A., Care M.M., Holland K. et al. Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *N Engl J Med* 2010;363(19):1801–11. DOI: 10.1056/NEJMoa1001671.
 47. Vézina C., Kudelski A., Sehgal S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28(10):721–6. DOI: 10.7164/antibiotics.28.721.
 48. Sehgal S.N., Baker H., Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28(10):727–32. DOI: 10.7164/antibiotics.28.727.
 49. Martel R.R., Klicius J., Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55(1):48–51. DOI: 10.1139/y77-007.
 50. Houchens D.P., Ovejera A.A., Riblet S.M., Slagel D.E. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983;19(6):799–805.
 51. Morris R.E., Wu J., Shorthouse R. A study of the contrasting effects of cyclosporine, FK 506, and rapamycin on the suppression of allograft rejection. *Transpl Proc* 1990;22(4):1638–41.
 52. Dilling M.B., Dias P., Shapiro D.N. et al. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 1994;54(4):903–7.

53. Heitman J., Movva N.R., Hall M.N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 1991;253(5022):905–9. DOI: 10.1126/science.1715094.
54. Van Duyn G.D., Standaert R.F., Karplus P.A. et al. Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* 1991;252(5007):839–42. DOI: 10.1126/science.1709302.
55. Choi J., Chen J., Schreiber S.L., Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 1996;273(5272):239–42. DOI: 10.1126/science.273.5272.239.
56. Yang H., Rudge D.G., Koos J.D. et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 2013;497(7448):217–23. DOI: 10.1038/nature12122.
57. Kahan B.D., Steinberg S., Bartlett S. et al. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multi-centre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000;356(9225):194–202. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02480-6.
58. Bissler J.J., McCormack F.X., Young L.R. et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2008;358(2):140–51. DOI: 10.1056/NEJMoa063564.
59. McCormack F.X., Inoue Y., Moss J. et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2011;364(17):1595–606. DOI: 10.1056/NEJMoa1100391.
60. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 7 декабря 2011 г. № 2199-р Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2012 г. [Order of the Government of the Russian Federation of December 7, 2011 No. 2199-p. On approval of the list of essential and essential drugs for 2012. (In Russ.)].
61. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 10 декабря 2018 г. № 2738-р Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2019 г. [Order of the Government of the Russian Federation of December 10, 2018 No. 2738-p On the Approval of the List of Essential and Essential Drugs for Medical Use for 2019. (In Russ.)].
62. Hütt-Cabezas M., Karajannis M.A., Zagzag D. et al. Activation of MTORC1/MTORC2 signaling in pediatric low-grade glioma and pilocytic astrocytoma reveals mTOR as a therapeutic target. *Neuro Oncol* 2013;15(12):1604–14. DOI: 10.1093/neuonc/not132.
63. Jentoft M., Giannini C., Cen L. et al. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;4(1):43–57.
64. Guertin D.A., Sabatini D.M. The Pharmacology of mTOR Inhibition. *Sci Signal* 2009;2(67):pe24. DOI: 10.1126/scisignal.267pe24.
65. Feldman M.E., Shokat K.M. New inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR pathway: insights into mTOR signaling from a new generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs). *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347(1):241–62. DOI: 10.1007/82-2010-64.
66. Sun S.Y. mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Lett* 2013;340(1):1–8. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.06.017.
67. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141(7):1117–34. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
68. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* 2011;2(12):1097–105. DOI: 10.1177/1947601911423031.
69. Couec M.L., André N., Thebaud E. et al. Bevacizumab and irinotecan in children with recurrent or refractory brain tumors: toxicity and efficacy trends. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(1):34–8. DOI: 10.1002/pbc.24066.
70. Nazarenko I., Hede S.M., He X. et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci* 2012;117(2):99–112. DOI: 10.3109/03009734.2012.665097.
71. McLaughlin M.E., Robson C.D., Kieran M.W. et al. Marked regression of metastatic pilocytic astrocytoma during treatment with imatinib mesylate (STI-571, Gleevec): a case report and laboratory investigation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25(8):644–8. DOI: 10.1097/00043426-200308000-00012.
72. Peyrl A., Azizi A., Czech T. et al. Tumor stabilization under treatment with imatinib in progressive hypothalamic-chiasmatic glioma. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52(4):476–80. DOI: 10.1002/pbc.21881.
73. Wetmore C., Daryani V.M., Billups C.A. et al. Phase II evaluation of sunitinib in the treatment of recurrent or refractory high-grade glioma or ependymoma in children: a children's Oncology Group Study ACNS1021. *Cancer Med* 2016;5(7):1416–24. DOI: 10.1002/cam4.713.
74. Sievert A.J., Lang S.S., Boucher K.L. et al. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(15):5957–62. DOI: 10.1073/pnas.1219232110.

Вклад авторов

Э.Ф. Валиахметова: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
Л.А. Ясько: обзор публикаций по теме статьи, редактирование текста рукописи;
Л.И. Папуша, А.Е. Друй: обзор публикации по теме статьи;
А.И. Карачунский: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

E.F. Valiakhmetova: reviewing of publications of the article's theme, article writing;
L.A. Yasko: reviewing of publications of the article's theme, article editing;
L.I. Papusha, A.E. Druy: reviewing of publications of the article's theme;
A.I. Karachunsky: developing the research design, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Э.Ф. Валиахметова/E.F. Valiakhmetova: <https://orcid.org/0000-0002-2977-665X>
Л.А. Ясько/L.A. Yasko: <https://orcid.org/0000-0003-3007-3772>
Л.И. Папуша/L.I. Papusha: <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>
А.Е. Друй/A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>
А.И. Карачунский/A.I. Karachunskiy: <https://orcid.org/0000-0002-9300-5198>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.03.2019. Принята к публикации: 20.06.2019.

Article received: 26.03.2019. Accepted for publication: 20.06.2019.

Асинхронная репликация генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и больных с полинеоплазиями

В.В. Цепенко, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, Г.О. Рухадзе, В.Ю. Скоропад

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Виктория Викторовна Цепенко mgrc@mrrc.obninsk.ru

Введение. Правильная репликация генома важна для нормального клеточного деления как гарантия неизменности передачи генетической информации. ДНК-репликация является строго регулируемым и синхронизированным процессом, нарушения в котором могут приводить к возникновению мутаций. Нарушения во времени ДНК-репликации влияют на экспрессию генов, вызывают изменения в эпигенетических модификациях и влияют на увеличение частоты структурных перестроек, что приводит к нестабильности генома. Нарушения во времени репликации (асинхронная репликация) часто сопровождают развитие рака.

Цель исследования — изучение встречаемости лимфоцитов периферической крови с асинхронной репликацией генов *AURKA* и *TP53* у больных раком желудка и больных с полинеоплазиями.

Материалы и методы. Асинхронность репликации генов *AURKA* и *TP53* определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в лимфоцитах периферической крови. Интерфазный FISH-анализ был выполнен у 37 здоровых доноров, 19 больных с неопухолевой патологией желудочно-кишечного тракта, 68 больных солитарным раком желудка и 39 пациентов с полинеоплазиями, т. е. с раком желудка и второй синхронной или метасинхронной опухолью.

Результаты. Доля лимфоцитов с асинхронной репликацией гена *AURKA* составила $19,8 \pm 0,5$ % для контрольной группы, $24,7 \pm 0,4$ % для группы с неопухолевой патологией, $32,5 \pm 0,5$ % для группы больных раком желудка и $39,5 \pm 0,6$ % для группы с полинеоплазиями; для гена *TP53* — $17,3 \pm 0,5$; $19,5 \pm 0,7$; $26,1 \pm 0,7$ и $32,5 \pm 0,6$ % соответственно. Различия между всеми обследованными группами были статистически значимы по обоим исследованным генам ($p < 0,01$). Больные раком желудка с метастазами имели большую долю лимфоцитов с асинхронной репликацией гена *AURKA*, чем пациенты без метастазов ($34,4 \pm 1,0$ % против $31,7 \pm 0,6$; $p = 0,02$).

Заключение. Высокий уровень лимфоцитов с асинхронной репликацией у онкологических больных может быть потенциальным маркером второй опухоли или возможного метастатического процесса, в том числе и на начальном уровне.

Ключевые слова: рак желудка, полинеоплазия, асинхронная репликация, ген *AURKA*, ген *TP53*, интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация

Для цитирования: Цепенко В.В., Михайлова Г.Ф., Шкаврова Т.Г. и др. Асинхронная репликация генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и больных с полинеоплазиями. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(2):42–7.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-42-47

Asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes in gastric cancer patients and patients with multiple tumors

V.V. Tsepenko, G.F. Mikhailova, T.G. Shkavrova, E.V. Goloub, G.O. Rukhadze, V.Yu. Skoropad

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249031, Russia

Background. The correct genome replication is essential for normal cell division to guarantee that genetic information comes changeless through the next cells generations. DNA replication is a strictly regulated and synchronous process and its disturbances could result to mutations appearances. Aberrant time of DNA replication affects on gene expression causes changes of epigenetic modifications and influences on increasing the structural rearrangements leading to enhanced genome disbalance. Replication time failure as asynchronous replication is common for cancerogeneses.

The objective of our study was the assessment of asynchronous replication levels in patients with gastric cancer and patients with multiple tumors.

Materials and methods. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used for the asynchronous replication of *AURKA* and *TP53* genes analyses. Interphase FISH on lymphocytes of peripheral blood of 37 healthy donors, 19 patients with non-cancer gastrointestinal pathologies, 68 patients with solitary gastric cancer and 39 patients with multiple tumors having gastric cancer and other second synchronous or metachronous tumor was carried out.

Results. Values of lymphocytes with asynchronous replication for *AURKA* were 19.8 ± 0.5 % for control group, 24.7 ± 0.4 % for non-cancer patients, 32.5 ± 0.5 % for gastric cancer patients, 39.5 ± 0.6 % for patients with multiple tumors and 17.3 ± 0.5 , 19.5 ± 0.7 , 26.1 ± 0.7 and 32.5 ± 0.6 % for *TP53* respectively. Differences between cell populations of examined groups had statistical significance with $p < 0.01$ for both studied gene. Also there was statistical difference between gastric cancer patients having distant metastases and gastric cancer patients without metastases for *AURKA* (34.4 ± 1.0 % vs. 31.7 ± 0.6 %; $p = 0.02$).

Conclusion. High lymphocytes with asynchronous replication level in oncological patients could serve as potential marker of second tumor or possible metastatic process including the earliest stage of it.

Key words: gastric cancer, multiple tumor, asynchronous replication, AURKA, TP53, interphase fluorescence in situ hybridization

For citation: Tsepenko V.V., Mikhailova G.F., Shkavrova T.G. et al. Asynchronous replication of AURKA and TP53 genes in gastric cancer patients and patients with multiple tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):42–7.

Введение

Одна из характеристик злокачественной трансформации — неконтролируемый клеточный рост, причиной которого часто является накопление генетических нарушений, вызванных повышенным мутагенезом и нестабильностью генома [1]. Поэтому правильная репликация генома важна для нормального клеточного деления как гарантия, что генетическая информация в неизменном виде перейдет в следующее клеточное поколение. ДНК-репликация является строго регулируемым процессом, в результате которого большая часть гомологичных локусов в геноме реплицирует в одно время, т. е. синхронно. Нарушения времени репликации могут приводить к раскоординации процесса и репликационному стрессу, т. е. к замедлению, замиранию или остановке репликационной вилки, что, в свою очередь, приводит к возникновению мутаций [2]. Нарушения во времени ДНК-репликации влияют на экспрессию генов, вызывают изменения в эпигенетических модификациях и влияют на увеличение частоты структурных перестроек. Это, в свою очередь, приводит к повышенной дестабилизации генома [3–5].

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что нарушения во времени репликации — асинхронная репликация — часто сопровождают развитие рака. В случае солидных опухолей нарушение синхронности репликации может наблюдаться не только в клетках опухолевой ткани, но и в нормальных клетках, например в лимфоцитах периферической крови [6].

Рак желудка (РЖ) занимает одну из лидирующих позиций в структуре смертности от онкологических заболеваний в мире и в частности в России [7]. Мировые тенденции, направленные на раннее выявление и диагностику заболевания, позволяют улучшить эффективность лечения и увеличить долговременную выживаемость. Другая сторона такой эффективности — повышающийся риск появления вторых опухолей. Приблизительно у 5–7 % пациентов с РЖ развиваются вторые синхронные или метакронные опухоли [8–10]. Поэтому важно выявлять пациентов, имеющих тенденцию к образованию вторых опухолей, которым требуются более тщательное наблюдение в последующий после лечения период [8]. Наличие дополнительных факторов, позволяющих формировать группы риска, будет полезным для клинической практики. В этом случае оценка уровня лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) может быть полезна, предоставляя дополнительную информацию о нестабильности генома.

Цель исследования — изучение встречаемости в периферической крови ЛАР генов AURKA и TP53 у больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями.

Материалы и методы

Группа обследованных лиц. В исследование были включены больные с неопухолевой патологией желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), больные солитарным РЖ и больные с полинеоплазиями.

В контрольную группу вошли 37 клинически здоровых доноров (21 мужчина и 16 женщин) в возрасте 21–70 лет (средний возраст 34 года). В группу больных с неопухолевой патологией были включены 19 человек (7 мужчин и 12 женщин) в возрасте 24–77 лет (средний возраст 51 год) со следующими диагнозами: желчно-каменная болезнь, холецистит, язва желудка, хронический панкреатит, гастрит. В группу больных солитарным РЖ были включены 68 человек (42 мужчины и 26 женщин) в возрасте 34–82 лет (средний возраст 62 года). В группу больных с полинеоплазиями были включены 39 человек (22 мужчины и 17 женщин) в возрасте 48–85 лет (средний возраст 68 лет), имевшие РЖ и вторые синхронные или метакронные опухоли; стадия заболевания варьировала от IA до IV.

Исследованные гены. Протоонкоген AURKA расположен в локусе 20q13.2. Вырабатываемый этим геном белок АуогоА из семейства тирозинкиназ играет критическую роль в регуляции митотических событий, таких как сборка веретена деления, функционирование centrosом и цитоскелета, а также процесса цитокинеза. В дополнение он играет ключевую роль в передаче сигналов от поврежденной ДНК к разнообразным эффекторам, включая сигнальный путь p53/TP53 и частично сигнальные пути, критические для онкогенной трансформации клеток. Сверхэкспрессия АуогоА подавляет экспрессию BRCA1/2, ATR/CHK1, p53, RAD51 и ряда других, тем самым инактивируя сигнальный путь ATM, при этом не происходит полноценной активации чекпойнтов и остановки клеточного цикла в фазах G1, S или G2. В свою очередь, это приводит к нарушениям реакций клетки на повреждения ДНК, что в том числе может выражаться в химио- и радиорезистентности опухолевых клеток [11].

Ген-супрессор TP53 расположен в локусе 17p13.1. Кодированный им белок p53 отвечает за реакцию на разнообразные клеточные стрессы, такие как повреждение ДНК, активация онкогенов, гипоксия, оксидативный стресс, вирусная инфекция, гипо- и гипертермия. Воздействуя на гены-мишени, связанные с TP53, p53 индуцирует защитные механизмы, такие как остановка

клеточного цикла, апоптоз, старение, ДНК-репарация или изменения метаболизма. Нарушение корректного функционирования гена *TP53* ведет к нарушению экспрессии белка p53. Мутации в гене *TP53* наблюдаются при многих онкологических заболеваниях, включая наследственные формы рака. В настоящее время общепризнано, что функциональная недостаточность гена *TP53* приводит к дестабилизации генома и возникновению рака [12].

Метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) на лимфоцитах периферической крови. Образцы венозной крови (4–6 мл) забирали с помощью вакуумной системы, содержащей Li-гепарин в концентрации 12–30 МЕ на 1 мл крови. Целую кровь разбавляли (1:9) теплым (+37 °C) раствором KCl (550 мг/110 мл) и помещали в термостат (+37 °C) на 30 мин. Затем проводили фиксацию клеток в смеси метанол/уксусная кислота (3:1). Клеточную суспензию (20–30 мкл) наносили на предварительно замороженные очищенные предметные стекла. В работе были использованы коммерческие наборы ДНК-зондов фирм Vysis (США) и Kreotech (Нидерланды) для генов *AURKA* и *TP53*. Пред- и постгибридизационные отмывки проводили в соответствии с инструкцией производителя. Для денатурации и гибридизации использовали гибридайзер Thermobrite (StatSpin, США).

Анализ и статистическая обработка. Анализ препаратов выполняли независимо двумя исследователями на флуоресцентном микроскопе AxioImager A-2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Gold (Vysis, США). Для каждого образца крови анализировали 300–900 интерфазных клеток с четкими сигналами (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием Microsoft Office Excel (2003). Полученные данные были объединены в вариационные ряды, для которых рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку

среднего. Во всех исследованных группах распределения показателей были близки к нормальным. Совокупности были однородными. Оценку достоверности различий среднегрупповых показателей проводили по двустороннему t-критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Асинхронная репликация в контрольной группе и группе больных с неопухолевой патологией. В качестве контроля в исследование были взяты образцы крови клинически здоровых доноров, было проанализировано 11 604 клетки для гена *AURKA* и 11 810 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР в группе варьировала от 13,7 до 23,8 % для гена *AURKA* и от 11,7 до 23,1 % для гена *TP53*. Среднегрупповой показатель доли ЛАР гена *AURKA* составил $19,8 \pm 0,5$ % ($\sigma = 2,8$), гена *TP53* – $17,3 \pm 0,5$ % ($\sigma = 2,8$). Сравнение среднегрупповых величин исследованных генов показало, что различие между ними было статистически значимо ($p = 7,2 \times 10^{-4}$): уровень ЛАР для гена *AURKA* был выше, чем для гена *TP53*.

В группе больных с неопухолевой патологией было проанализировано 5776 клеток для гена *AURKA* и 5680 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР гена *AURKA* варьировала от 21,2 до 27,7 % и в среднем по группе составила $24,7 \pm 0,4$ % ($\sigma = 1,9$). Для гена *TP53* доля ЛАР варьировала от 13,0 до 25,3 % и в среднем по группе составила $19,5 \pm 0,7$ % ($\sigma = 3$). Как и в контрольной группе, различие между среднегрупповыми показателями доли ЛАР исследованных генов было статистически значимо ($p = 10^{-4}$): доля ЛАР гена *AURKA* была выше доли ЛАР гена *TP53*. Кроме этого, среднегрупповой показатель ЛАР в группе больных с неопухолевой патологией был выше, чем в контрольной группе для обоих исследованных генов ($p = 10^{-4}$ и $p = 0,01$ соответственно).

Асинхронная репликация исследованных генов у больных солитарным РЖ. В группе больных солитарным

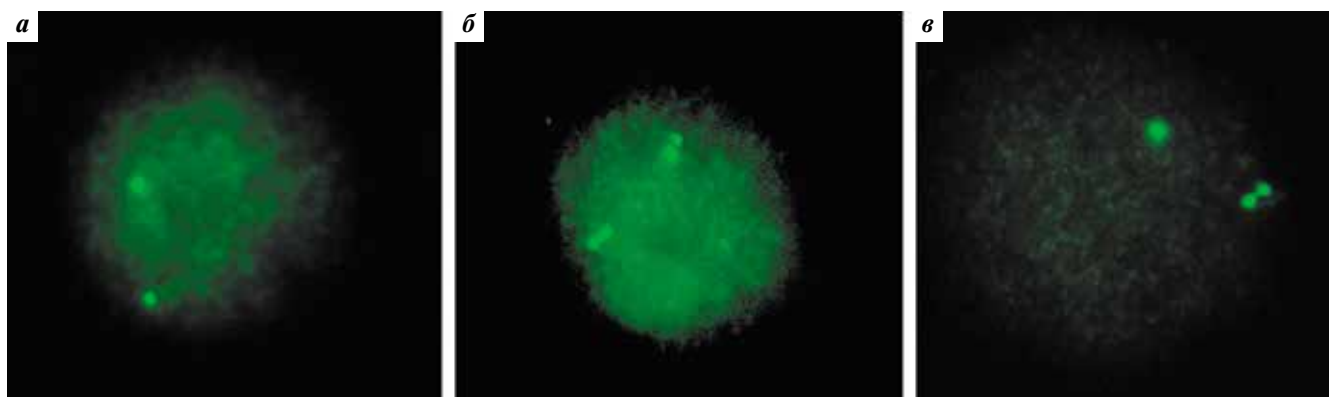


Рис. 1. Статус репликации гена *AURKA*: а – лимфоцит периферической крови с еще не реплицированной ДНК, видны 2 одиночных сигнала (SS-клетка); б – лимфоцит периферической крови с реплицированной ДНК, видны 2 двойных сигнала (DD-клетка); в – лимфоцит периферической крови с асинхронной репликацией, виден 1 одиночный и 1 двойной сигнал (SD-клетка)

Fig. 1. DNA replication status of gene *AURKA*: a – peripheral blood lymphocyte with non replicated DNA shown two single signals (SS cell); б – lymphocyte with replicated DNA shown two double signals (DD cell); в – lymphocyte with asynchronous replication shown one single and one double signal (SD cell)

РЖ было проанализировано 21 365 клеток для гена *AURKA* и 20 071 клетка для гена *TP53*. Доля ЛАР гена *AURKA* колебалась от 22,0 до 42,0 %, гена *TP53* — от 18,3 до 38,9 %. Среднегрупповой уровень ЛАР гена *AURKA* составил $32,5 \pm 0,5$ % ($\sigma = 4,2$), гена *TP53* — $26,1 \pm 0,5$ % ($\sigma = 4,1$). Доля ЛАР гена *AURKA* была выше, чем таковая гена *TP53* ($p = 10^{-4}$). Также наблюдались статистически значимые различия между среднегрупповыми показателями ЛАР у больных солитарным РЖ, больных с неопухолевыми патологиями и в контрольной группе для обоих исследованных генов. Доля ЛАР гена *AURKA* в группе больных солитарным РЖ была выше доли ЛАР как в контрольной группе ($p = 10^{-4}$) с высоким уровнем значимости, так и у больных с неопухолевой патологией ($p = 10^{-4}$). Аналогичные результаты были получены и для гена *TP53* ($p = 10^{-4}$).

В группе больных РЖ была выделена подгруппа ($n = 16$) с клинически установленным наличием метастазов. Данная подгруппа имела среднегрупповой показатель доли ЛАР гена *AURKA* ($34,4 \pm 1,0$ %; $\sigma = 3,8$) выше, чем в подгруппе ($n = 52$) больных РЖ без метастазов ($31,7 \pm 0,6$ %; $\sigma = 4,2$). Это превышение было статистически значимо ($p = 0,024$). Для гена *TP53* различий в подгруппах не наблюдалось ($p = 0,488$).

Асинхронная репликация исследованных генов у больных с полинеоплазиями. В группе больных с полинеоплазиями было проанализировано 11 804 клетки для гена *AURKA* и 11 396 клеток для гена *TP53*. Доля ЛАР колебалась от 31,3 до 45,6 % для гена *AURKA* и от 21,0 до 44,4 % для гена *TP53*. Среднегрупповой показатель ЛАР гена *AURKA* составил $39,5 \pm 0,6$ % ($\sigma = 3,8$), гена *TP53* — $32,5 \pm 0,6$ % ($\sigma = 3,9$). Доля ЛАР гена *AURKA* была выше, чем доля ЛАР гена *TP53* ($p = 10^{-4}$). Статистический анализ показал, что среднегрупповые показатели ЛАР обоих исследованных генов были значимо ($p = 10^{-4}$) выше по сравнению с таковыми в контрольной группе, группе больных с неопухолевой патологией ЖКТ и группе больных солитарным РЖ.

Обсуждение

Анализ данных литературы [6] продемонстрировал, что исследования доли ЛАР генов *TP53*, *RBI*, *AML1*, *C-MYC*, *HER-2/neu*, проведенные у больных с солидными опухолями, такими как рак предстательной железы, почечно-клеточная карцинома, рак молочной железы, а также сравнение с долей ЛАР этих генов у здоровых лиц показали, что контрольные группы характеризуются уровнем ЛАР, не превышающим 20 %, в то время как больные с солидными опухолями демонстрируют уровни ЛАР, превышающие 30 %. Кроме этого, больные с так называемыми предраковыми заболеваниями, такими как нейрофиброматоз 1-го типа, цирроз печени или полицитемия, также имеют более высокую долю ЛАР по сравнению со здоровыми донорами, но этот уровень остается значимо ниже, чем у онкологических больных. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ других

исследователей. В нашем исследовании доля ЛАР генов *AURKA* и *TP53* была самой низкой в контрольной группе, повышена в группе больных с неопухолевой патологией ЖКТ и значительно повышена в группах больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями (рис. 2). Кроме этого, группа пациентов с 2 опухолями и более имела статистически значимое ($p < 0,01$) превышение доли ЛАР по обоим исследованным генам по сравнению с группой пациентов, имеющих одну опухоль. В группе больных с полинеоплазиями мы не наблюдали различий в уровнях ЛАР у больных с метастатическими и синхронными опухолями. Следует отметить, что больные с множественными опухолями имели высокие уровни ЛАР даже в случаях большого промежутка времени между появлением первой и второй опухоли (10 лет и более). Также больные солитарным РЖ с отдаленными метастазами имели более высокий уровень ЛАР гена *AURKA*, чем больные без метастазов.

Вероятно, высокие уровни нарушения синхронности репликации в лимфоцитах периферической крови являются отражением процессов, приводящих к геномной нестабильности в организме онкологических больных, проявляющихся в виде либо второй опухоли, либо метастазирования. В нашем исследовании статистически значимые различия между подгруппами с метастазами и без метастазов наблюдались для гена *AURKA*, являющегося протоонкогеном, в то время как для гена-супрессора *TP53* этих различий не отмечалось.

Известно, что *AuToGaA* имеет высокие уровни экспрессии при различных солидных раках, таких как рак молочной железы, яичников, прямой кишки, РЖ [13]. Авторами показано, что высокие уровни экспрессии связаны с низкой выживаемостью и плохим прогнозом. Кроме этого, сверхэкспрессия *AuToGaA* считается ранним критическим событием при развитии инвазивных форм рака молочной железы. В настоящее время связь нарушений во времени репликации с канцерогенезом остается до конца не изученной. Однако известно, что отдельные онкогены могут оказывать влияние на время репликации. Например, ген *C-MYC* вовлечен в процесс репликации, и нарушение его работы может приводить к преждевременной инициации точек начала репликации, тем самым приводя к обширным изменениям в программе времени репликации [2].

Таким образом, можно предположить, что оценка уровня асинхронности репликации протоонкогенов может быть информативна, особенно на ранних этапах канцерогенеза. Мы предполагаем, что высокий уровень ЛАР у онкологических больных может быть потенциальным маркером второй опухоли или возможного метастатического процесса, в том числе на начальном этапе. Данное предположение требует подтверждения проведением динамического наблюдения онкологических больных после лечения. Также не вызывает сомнения, что больные РЖ, особенно молодого

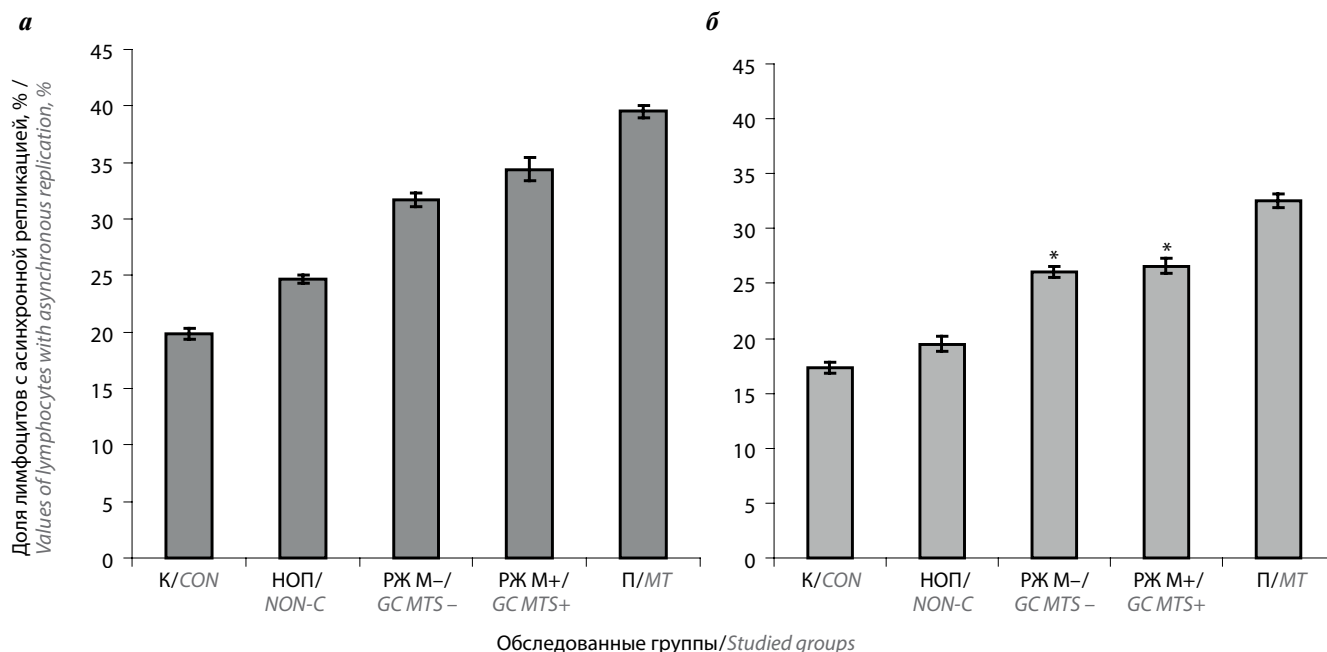


Рис. 2. Среднегрупповые показатели ($M \pm m$) доли лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *AURKA* (а) и *TP53* (б) в обследованных группах. К — контрольная группа здоровых доноров; НОП — пациенты с неопухолевой патологией желудочно-кишечного тракта; РЖ М— — больные солитарным РЖ без метастазов; РЖ М+ — больные солитарным РЖ с подтвержденным наличием метастазов; П — больные с полинеоплазиями. Различия среднегрупповых показателей были достоверны ($p < 0,05$) для всех сравниваемых групп по исследованным генам, кроме отмеченных звездочкой

Fig. 2. Average group values ($M \pm m$) of lymphocytes with asynchronous replication for genes *AURKA* (a) and *TP53* (b) in studied groups: CON — control group of healthy donors; NON-C — patients with non-cancer gastrointestinal pathologies; GC MTS— — patients with solitary gastric cancer without metastases; GC MTS+ — patients with solitary gastric cancer having distant metastases; MT — patients with multiple tumors having gastric cancer and other second synchronous or metachronous tumor. Statistical differences between average group values were significant ($p < 0.05$) for all examined groups except “*” marked

возраста, нуждаются в последующем наблюдении после лечения для раннего выявления возможного возникновения вторых опухолей.

Заключение

В группах больных солитарным РЖ и больных с полинеоплазиями наблюдаются более высокие уровни ЛАР генов *AURKA* и *TP53* по сравнению с группами здоровых лиц и больных с неопухолевой патологией ЖКТ. Кроме этого, группа больных с полинеоплазиями характеризуется более высоким уровнем ЛАР по обоим исследованным генам по сравнению с группой больных солитарным РЖ. Это свидетельствует о большей ге-

номной нестабильности в группе больных с полинеоплазиями, которая проявляется в виде второй опухоли.

Группа больных солитарным РЖ, имеющих отдаленные метастазы, демонстрирует более высокий уровень ЛАР гена *AURKA* по сравнению с группой больных солитарным РЖ без метастазов. Следовательно, высокая доля ЛАР гена *AURKA* у больных солитарным РЖ может быть потенциальным указателем на наличие процессов метастазирования. Однако данное предположение требует проведения дальнейших исследований.

Для гена *AURKA*, являющегося протоонкогеном, наблюдалась более высокая встречаемость ЛАР по сравнению с геном-супрессором *TP53*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Blumenfeld B., Ben-Zimra M., Simon I. Perturbations in the replication program contribute to genomic instability in cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(6):1138. DOI: 10.3390/ijms18061138.
- Donley N., Thayer M.J. DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2013;23(2):80–9. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.01.001.
- Farkash-Amar Sh., Itamar S. Genome-wide analysis of the replication program in mammals. *Chromosome Res* 2010;18:115–25. DOI: 10.1007/s10577-009-9091-5.
- Ryba T., Battaglia D., Chang B.H. et al. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Res* 2012;22(10):1833–44. DOI: 10.1101/gr.138511.112.
- Михайлова Г.Ф., Цепенко В.В., Шкаврова Т.Г., Голуб Е.В. Асинхронная репликация у онкологических больных. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(1):26–34. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-26-34. [Mikhailova G.F., Tsepenco V.V., Shkavrova T.G.,

- Goloub E.V. Asynchronous replication in oncological patients. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):26–34. (In Russ.).
7. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS radiologii” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.).]
 8. Kim J.W., Jang J.Y., Chang Y.W., Kim Y.H. Clinical features of second primary cancers arising in early gastric cancer patients after endoscopic resection. *World J Gastroenterol* 2015;21(27):8358–65. DOI: 10.3748/wjg.v21.i27.8358.
 9. Ławniczak M., Gawin A., Jaroszewicz-Heigelmann H. et al. Synchronous and metachronous neoplasms in gastric cancer patients: a 23-year study. *World J Gastroenterol* 2014;20(23):7480–7. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7480.
 10. Chirila N.D., Turdeanu N.A., Constantea N.A. et al. Multiple malignant tumors. *Chirurgia* 2013;108(4):498–502.
 11. Katsha A., Belkhiri A., Goff L., El-Rifai W. Aurora kinase A in gastrointestinal cancers: time to target. *Molecular Cancer* 2015;14:106. DOI 10.1186/s12943-015-0375-4.
 12. Алмазов В.П., Кочетков Д.В., Чумаков П.М. p53 – инструмент для терапии злокачественных заболеваний человека. *Молекулярная биология* 2007;41(6):947–63. [Almazov V.P., Kochetkov D.V., Chumakov P.M. The use of p53 as a tool for therapy of human cancer. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2007;41(6):947–63. (In Russ.).]
 13. Zhu X., Mei J., Wang Zh. AuroraA kinase: potential tumor marker of osteosarcoma. *J Can Res Ther* 2014;10(2):102–7. DOI: 10.4103/0973-1482.145804.

Вклад авторов

В.В. Цепенко: анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Г.Ф. Михайлова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме исследования;
Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, Г.О. Рухадзе: получение данных для анализа;
В.Ю. Скоропад: формирование групп пациентов, получение данных для анализа.

Authors' contributions

V.V. Tsepenko: analysis of the obtained data, article writing;
G.F. Mikhailova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme;
T.G. Shkavrova, E.V. Goloub, G.O. Rukhadze: obtaining data for analysis;
V.Yu. Skoropad: forming patient groups, obtaining data for analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.В. Цепенко/V.V. Tsepenko: <https://orcid.org/0000-0002-5278-0809>
Т.Г. Шкаврова/T.G. Shkavrova: <https://orcid.org/0000-0002-7950-2585>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* при миелопролиферативных заболеваниях

Л.А. Кесаева¹, А.Ю. Буланов², Ю.П. Финашутина¹, В.В. Тихонова¹, О.Н. Солопова¹,
Е.Н. Мисюрина², Н.Н. Касаткина¹, Н.А. Лыжко¹, В.А. Мисюрин¹, А.А. Турба³,
А.А. Солодовник¹, И.Н. Солдатова³, А.В. Мисюрин³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 123182 Москва, Пехотная ул., 3;

³ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Лаура Артуровна Кесаева kelar-22@mail.ru

Молекулярно-генетические исследования для определения соматических мутаций в гене кальретикулина (*CALR*) включены в клинические рекомендации Всемирной организации здравоохранения в качестве одних из основных диагностических критериев миелопролиферативных заболеваний. Примерно в 25–35 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза выявлены мутации в гене *CALR*, наличие которых ассоциировано с благоприятным прогнозом течения заболевания. В нашем исследовании выполнено сравнение результатов молекулярно-генетических методов для определения мутаций в гене *CALR*. Проведен анализ образцов периферической крови 379 пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями и 17 образцов крови здоровых доноров. Наличие мутаций в гене *CALR* определяли методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией и количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, методом секвенирования по Сэнгеру и анализом кривых плавления. Мутации в гене *CALR* определены у 97 (25,5 %) пациентов методом анализа кривых плавления. Из них у 87 (23,0 %) пациентов мутации в гене найдены методом секвенирования по Сэнгеру. С помощью полимеразной цепной реакции мутации в гене *CALR* были обнаружены у 84 (22,1 %) пациентов.

Ключевые слова: *CALR*, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз

Для цитирования: Кесаева Л.А., Буланов А.Ю., Финашутина Ю.П. и др. Сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* при миелопролиферативных заболеваниях. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(2):48–54.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-48-54

Comparison of molecular genetic methods of detection of mutations in the *CALR* gene in myeloproliferative disorders

L.A. Kesaeva¹, A.Yu. Bulanov², Yu.P. Finashutina¹, V.V. Tikhonova¹, O.N. Solopova¹, E.N. Misyurina², N.N. Kasatkina¹,
N.A. Lyzhko¹, V.A. Misyurin¹, A.A. Turba³, A.A. Solodovnik¹, I.N. Soldatova³, A.V. Misyurin³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²City Clinical Hospital No 52 of the Moscow Healthcare Department; 3 Pekhotnaya St., Moscow 123182, Russia;

³GeneTechnology; 104 Profsoyuznaya St., 117485 Moscow, Russia

Molecular genetic detection of *CALR* gene somatic mutations is required for myeloproliferative neoplasms diagnosis and treatment according to the novel WHO clinical recommendations. *CALR* mutations are found in approximately 25–35 % cases of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis and they are associated with benign clinical outcome. In this study we have compared sensitivity and selectivity of several different options of *CALR* mutation molecular genetic detection in blood samples of 379 CMD patients and 17 healthy donors. Among methods compared in our study there have been conventional polymerase chain reaction with electrophoretic detection, real-time quantitative polymerase chain reaction, direct Sanger sequencing of polymerase chain reaction fragments and polymerase chain reaction high resolution melting curve analysis. By means of melting curve analysis *CALR* mutations have been found in 97 (25.5 %) patients, whereas in the cases of Sanger sequencing and polymerase chain reaction there have been 87 (23.0 %) and 84 (22.1 %) *CALR* mutation positive patients respectively.

Key words: *CALR*, polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis

For citation: Kesaeva L.A., Bulanov A.Yu., Finashutina Yu.P. et al. Comparison of molecular genetic methods of detection of mutations in the *CALR* gene in myeloproliferative disorders. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):48–54.

Введение

Ph-негативные клональные заболевания, возникающие на уровне стволовой кроветворной клетки, составляют группу миелопролиферативных (МПЗ). Хронические МПЗ характеризуются пролиферацией 1 или более клеточной линии миелопоэза в костном мозге, сохраняющей способность дифференцироваться по всем росткам кроветворения [1, 2]. К самым распространенным МПЗ относятся истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и первичный миелофиброз (ПМФ). Основным диагностическим маркером данных заболеваний является мутация *JAK2 V617F*, встречающаяся практически в 95 % случаев при истинной полицитемии и в 50–60 % случаев при ЭТ и ПМФ [3]. Мутации в гене *MPL* присутствуют в 5–10 % случаев у пациентов с ЭТ и ПМФ при отсутствии мутации *JAK2*. Тем не менее около 35 % пациентов с ЭТ и ПМФ не имеют мутаций в этих 2 генах, что затрудняет постановку достоверного диагноза. В 2013 г. 2 группы исследователей независимо друг от друга обнаружили соматические мутации в 9-м экзоне гена кальретикулина (*CALR*; идентификационный номер NG_029662.1) в 67 и 84 % случаев у пациентов с ЭТ, у которых не найдено мутации *JAK2 V617F* и *MPL* [4, 5].

Мутации в гене *CALR* являются вторыми по частоте встречаемости после мутаций *JAK2 V617F*, которые были включены в диагностические критерии МПЗ. Их выявление свидетельствует о клональном характере заболевания и помогает в дифференцировании ЭТ и ПМФ от ряда других миелоидных неоплазий, а также вторичных эритроцитозов и тромбоцитозов. Мутации *CALR* были выявлены всего в 8 % случаев при миелодиспластическом синдроме и в единичных случаях при других миелоидных неоплазиях. Важно, что ни в одном случае заболеваний немиелоидной природы мутации в данном гене не обнаружены [5].

Кальретикулин представляет собой многофункциональный белок, находящийся преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме. Ген расположен на коротком плече хромосомы 19 и состоит из 9 экзонов [6]. Выполняет шаперонную функцию, участвует в регуляции кальциевого гемостаза [7].

В гене *CALR* встречается около 60 типов мутаций, но самые частые из них — мутации 2 типов: 1-й — с.1092_1143del (p.L367fs*46), при котором происходит делеция 52 нуклеотидов, и 2-й — с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47), при котором происходит инсерция 5 нуклеотидов. У пациентов, имеющих 1-й тип мутации, при ЭТ происходит более быстрое прогрессирование в ПМФ в отличие от пациентов, имеющих 2-й тип мутации. При ЭТ около 50 % *CALR*-положительных больных имеют мутацию 1-го типа, около 40 % — мутацию 2-го, и оставшиеся 10 % приходятся на другие типы мутаций. При ПМФ у 70 % *CALR*-положительных больных обнаруживается 1-й тип мутаций, у 13 % — мутация 2-го типа, и оставшиеся 17 % приходятся на другие типы мутаций. Пациенты при ЭТ и ПМФ с мутацией гена

CALR имели лучшую общую выживаемость по сравнению с теми, у кого не выявлено данной мутации [8].

Мутации в гене *CALR* могут быть идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов диагностики: секвенирования по Сэнгеру, анализа кривых плавления (КП), полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), оригинальной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией. У каждого из этих методов разные чувствительность и эффективность.

Цель исследования — сравнение молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR*.

Материалы и методы

В настоящее исследование включены 379 пациентов с хроническим МПЗ, а также взяты 17 образцов крови здоровых доноров. Пробы крови для молекулярно-генетических исследований брали из локтевой вены утром натощак в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Для выделения геномной ДНК использовали набор реагентов «ДНК-экстракт» (Гено-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. Для поиска последовательности гена *CALR*, к которой нужно подобрать праймеры, использовали биоинформационную базу данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, США). Для подбора оригинальных праймеров и условий проведения ПЦР с ними использовали программу Vector NTI 10.

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили в амплификаторе DTLite 4IL («ДНК-технология»). Объем реакционной смеси для ПЦР — 25 мкл. Состав: 2 × ПЦР-буфер, 0,25 мМ MgCl₂ (Promega), 0,25 мМ dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера и зонда. Праймеры и зонды, использованные при ПЦР-РВ, представлены в таблице.

Последовательности праймеров и зондов, использованных при полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Primer and probe sequences used in real-time polymerase chain reaction

Название Name	5'—3'—последовательность 5'—3'—sequence
prCALR-52bp	R6G-ACGAGGAGCAGTGGACA-AGGAGGATG-BHQ1
CALR-F-del52	AAG GCC CTGAGGTGTGTG CT
CALR-R-del52	CCT CCTTGTCTCTG CTC CTA G
prCALR-TTGTC	R6G-CAGAGGACAATTGTCTGGAG-GATGAT-BHQ1
CALR FITTGTC	CTGCAGGCAGCAGAGAAACAAAT
CALRR1-TTGTC	GGGACATCTTCTCCTCATCTT

Тип флуорофора — R6G (HEX). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при

температуре 94 °C в течение 5 мин с последующими 40 циклами, состоящими из денатурации при 94 °C в течение 15 с, отжига при 60 °C в течение 60 с.

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК. По окончании ПЦР-амплификации в режиме реального времени по значениям положительных контролей с известной концентрацией строились калибровочные кривые для нормы и для мутации 1-го или 2-го типа. Исходя из значения порогового цикла (Ct) определяли исходное число копий дикого типа гена *CALR* и гена с мутацией в каждом клиническом образце. Для более точного определения числа копий гена каждый клинический образец ставили в 2 повторах, для расчетов использовали среднее значение числа копий ($Q_{\text{мутация}}$ и $Q_{\text{норма}}$). Определение числа копий гена проводили с помощью компьютерных программ, прилагаемых к ПЦР-амплификатору.

В амплификаторе Терцик («ДНК-технология») выполняли ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Объем реакционной смеси для ПЦР — 25 мкл. Состав: 5 × ПЦР-буфер (Promega), 0,25 мМ $MgCl_2$ (Promega), 0,25 мМ dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера. В определении мутаций 9-го экзона гена *CALR* использовали праймеры с прилежащими участками интронов (прямой праймер: 5'-TAACAAAGGTGAG-GCCTGGT-3'; обратный праймер: 5'-GCCTCTCTACAGCTCGTCCTT-3'). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при температуре 94 °C в течение 5 мин с последующими 30 циклами, состоящими из денатурации при 94 °C в течение 20 с, отжига при 67 °C в течение 20 с и элонгации при 72 °C в течение 90 с. Финальную элонгацию выполняли при температуре 72 °C в течение 5 мин. Результат амплификации — фрагмент размером 298bp.

Электрофоретическую детекцию продуктов амплификации осуществляли в 6 % полиакриламидном геле в ТБЭ-буфере (рН 8,3) при 200 В и комнатной температуре. Визуализацию проводили после окраски бромистым этидием в ультрафиолетовом спектре. Специфичность амплификации была подтверждена методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Метод прямого секвенирования по Сэнгеру. При определении мутаций 9-го экзона гена *CALR* с помощью прямого секвенирования ПЦР продуктов по Сэнгеру использовали праймеры с прилежащими участками интронов (прямой праймер *CALR-F*: 5'-TAACAAAGGTGAGGCCTGGT-3', обратный праймер *CALR-R*: 5'-GCC-TCTCTACA-GCTCGTCCTT-3'). Секвенирование фрагментов ДНК выполняли с использованием генетического анализатора AB310 (Applied BioSystems, США). Результаты секвенирования предварительно обрабатывали с помощью штатных программ, поставляемых вместе с генетическим анализатором, а затем изучали в пакете программ Vector NTI 11.5.1.

Анализ КП с высокой разрешающей способностью. Анализ КП проводили на приборе Light Cycler 96

(Roche, Швейцария). Объем реакционной смеси для теста — 20 мкл. В качестве флуоресцентного красителя использовали 5 × ПЦР-буфер Sybr Green (Evrogen), 1 ед. Taq-полимеразы (Sileks), 200 нМ каждого праймера. В исследовании использовали праймеры, покрывающие 9-й экзон гена *CALR* с прилежащими участками интронов (прямой праймер *CALR-F1*: 5'-CTGCAGGCAGCAGAGAAACAAAT, обратный праймер *CALR-R1*: 5'-GGGACATCTTCCTCCTCATCTT). Реакционная смесь была подвергнута первоначальной денатурации при температуре 95 °C в течение 10 мин с последующими 45 циклами, состоящими из денатурации при 95 °C в течение 10 с, отжига при 58 °C в течение 20 с. Программа КП включала денатурацию при 95 °C на 1 мин, повторное насыщение при 40 °C в течение 1 мин и плавление от 67 до 95 °C. Тип флуорофора — Sybr Green.

Проводили сравнение КП образцов пациентов с КП образцов здоровых доноров (*CALR* дикого типа), 1 положительный контроль с мутацией 1-го типа и 1 положительный контроль с мутацией 2-го типа были включены в каждый эксперимент.

Получение рекомбинантной плазмиды. Кодирующую последовательность гена *CALR* образцов получали с помощью ПЦР с праймерами *CALR-F1* и *CALR-R1* с ДНК, выделенной из гранулоцитов периферической крови. ПЦР-фрагмент был клонирован в плазмиду pGEM-T Easy (Promega) согласно инструкции производителя. Каждый из полученных клонированных образцов проверяли на 6 % акриламидном геле методом электрофореза на наличие мутантной полосы. Затем все выбранные клонированные образцы были секвенированы методом Сэнгера независимо от наличия или отсутствия мутантной полосы.

Статистический анализ. Для сравнения разных методов детекции по чувствительности применяли χ^2 -критерий. Для анализа использовали дискретные данные о количестве случаев выявленных и невыявленных дефектов гена *CALR*. Обнаруженные различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На рис. 1 представлены результаты определения мутаций 9-го экзона гена *CALR* методами стандартной ПЦР с электрофорезом и ПЦР-РВ, секвенирования по Сэнгеру и КП.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени и ПЦР с электрофоретической детекцией. На рис. 2 представлены результаты определения мутаций гена *CALR* 1-го и 2-го типа методами ПЦР-РВ и ПЦР с электрофоретической детекцией. Результаты ПЦР-РВ полностью совпали с результатами ПЦР с электрофоретической детекцией. Из 379 клинических образцов было выявлено 84 (22,1 %) случая с мутациями 1-го (31/84) и 2-го (53/84) типа 9-го экзона гена *CALR*.

Метод прямого секвенирования по Сэнгеру мутаций 9-го экзона гена *CALR* был выполнен для всех

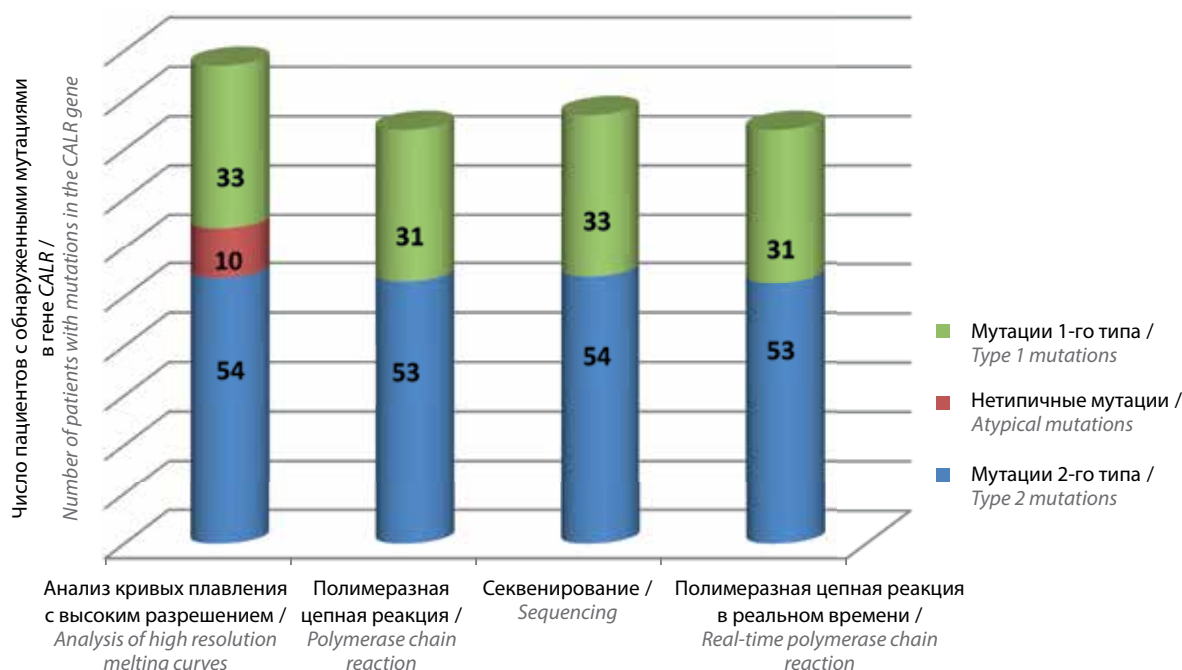


Рис. 1. Детекция мутаций 9-го экзона гена *CALR* различными методами у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями
Fig. 1. Detection of 9th exon mutations in the *CALR* gene using different methods in patients with myeloproliferative disorders

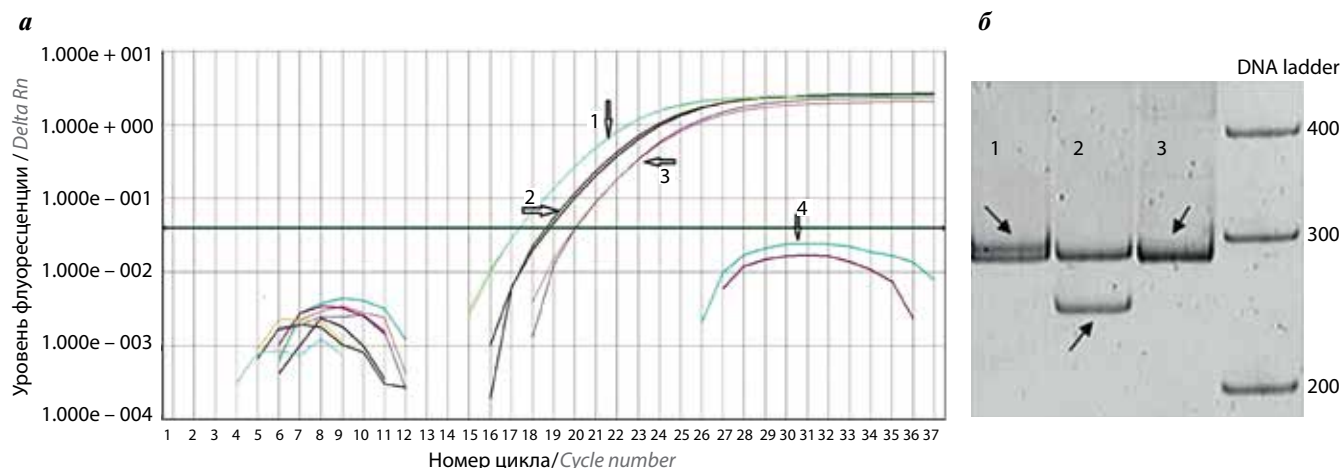


Рис. 2. Примеры результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и электрофореграммы в пробах с разными типами мутаций в гене *CALR*: а – график накопления флуоресцентного сигнала: 1 – дикий тип гена *CALR*; 2 – проба с мутацией в гене *CALR* 1-го типа; 3 – проба с мутацией в гене *CALR* 2-го типа; 4 – проба без мутации; б – электрофореграмма: 1 – проба с мутацией в гене *CALR* 2-го типа; 2 – проба с мутацией в гене *CALR* 1-го типа; 3 – проба без мутации
Fig. 2. Examples of results of real-time polymerase chain reaction and electropherogram in samples with different types of mutations in the *CALR* gene: а – accumulation of fluorescent signal: 1 – wild-type *CALR* gene; 2 – sample with type 1 mutation in the *CALR* gene; 3 – sample with type 2 mutation in the *CALR* gene; 4 – sample without mutations; б – electropherogram: 1 – sample with type 2 mutation in the *CALR* gene; 2 – sample with type 1 mutation in the *CALR* gene; 3 – sample without mutations

пациентов. В результате подтверждено наличие мутаций 1-го (33/87) и 2-го (54/87) типа у 87 (23 %) образцов из 379.

Анализ КП с высокой разрешающей способностью. В группе из 379 пациентов с МПЗ образцы крови 97 (25,5 %) пациентов четко показали отличие КП от группы дикого типа. При сопоставлении данных, представленных в нормализованных и производных графиках, индивидуальный характер КП мутантных образцов подтвердился (рис. 3а, б).

Из 97 образцов, определенных по данным анализа КП как мутированные, были идентифицированы 87 с мутациями 1-го (33/87) и 2-го (54/87) типа, что полностью коррелировало с результатами секвенирования по Сэнгеру. Однако оставшиеся 10 образцов были определены как отрицательные на мутации в гене *CALR* по результатам секвенирования и ПЦР. В дальнейшем ПЦР-фрагменты этих образцов были клонированы, и для каждого образца проанализировано не менее 150 клонов методом SSCP-электрофореза. На рис. 3в показан

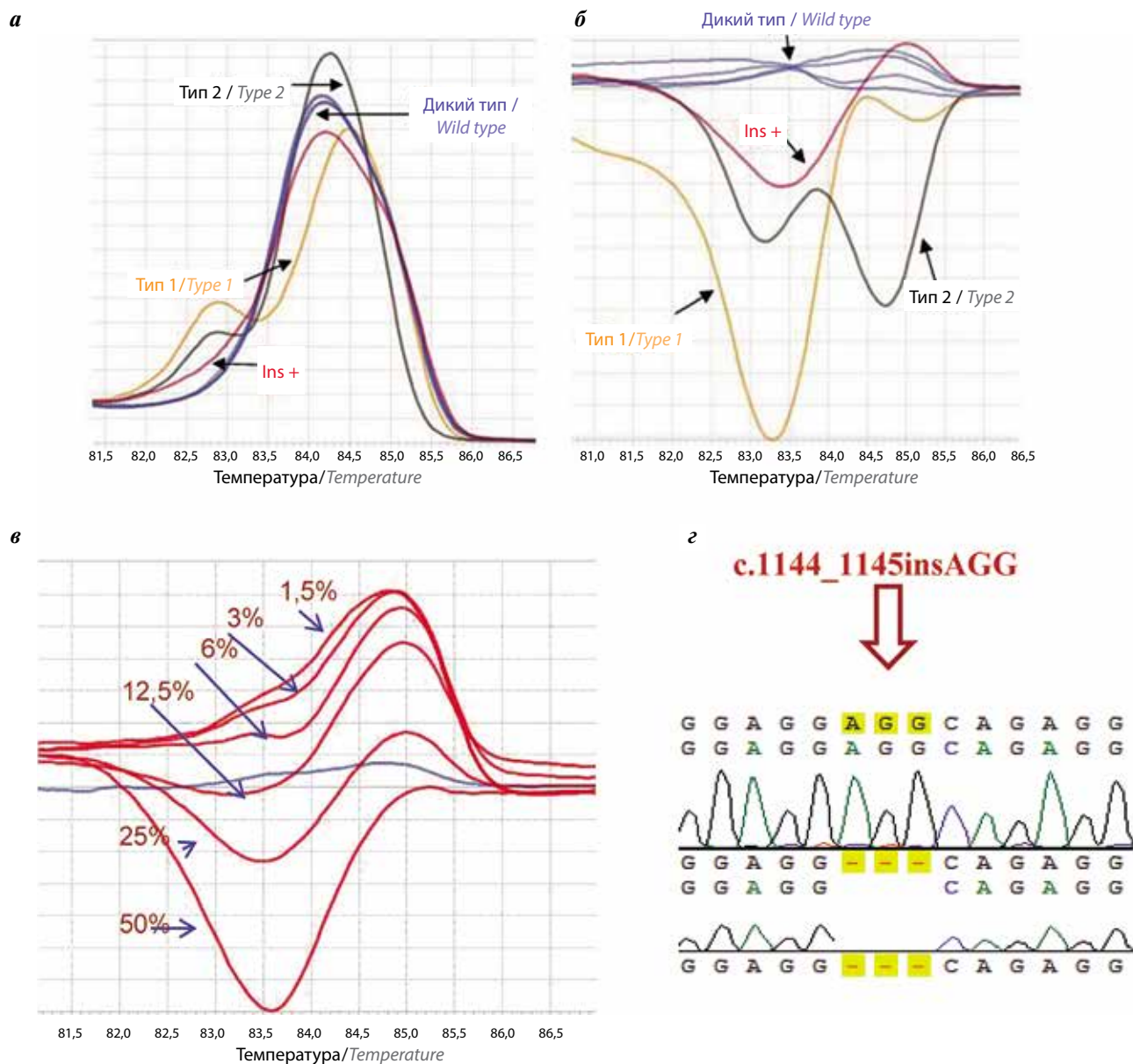


Рис. 3. Детекция мутаций 9-го экзона гена *CALR* в ДНК пациентов методом анализа кривых плавления на приборе *Light Cycler 96* (ROCHE): а – нормализованные кривые плавления; б – производные кривых плавления. На рис. а и б изображены: мутации 1-го (с.1092_1143del (p.L367fs*46)) и 2-го типа (с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)) 9-го экзона гена *CALR*, нетипичная мутация *Ins+* (с.1144_1145insAGG), образец без мутации (дикий тип); в – результат анализа кривой плавления серии разведений плазмиды с фрагментом гена *CALR* с с.1144_1145insAGG; г – результат анализа секвенирования по Сэнгеру гена *CALR* клонированного образца, несущего с.1144_1145insAGG

Fig. 3. Detection of exon 9 mutations in the *CALR* gene in DNA of patients using analysis of melting curves with the *Light Cycler 96* (ROCHE) device: а – normalized melting curves; б – melting curves derivatives. Figures а and б: type 1 (с.1092_1143del (p.L367fs*46)) and type 2 (с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)) mutations of exon 9 in the *CALR* gene, atypical mutation *Ins+* (с.1144_1145insAGG), sample without mutations (wild type); в – result of melting curve analysis of a series of dilutions of a plasmid with a fragment of the *CALR* gene with с.1144_1145insAGG; г – result of Sanger sequencing of a cloned sample of the *CALR* gene containing с.1144_1145insAGG

образец, несущий нетипичную мутацию с.1144_1145ins-AGG, который был использован в качестве эталона. Серийные разведения начинали с 50 % аллельной нагрузки и в итоге обнаружили до 1,5 % мутантных аллелей методом анализа КП. Положительные клоны были снова проверены методом по Сэнгеру в качестве подтверждающего «золотого стандарта» (рис. 3г). В результате у 2 образцов была подтверждена мутация 2-го типа, у 1 – мутация 1-го типа. Один из образцов

был подтвержден как отрицательный. Остальные 6 несли в себе нетипичные инсерции и делеции в гене *CALR*:

- с.1135_1144 del – 10
- с.1144_1145 ins + 3
- с.1133_1151del – 19
- с.1100_1145 del – 46
- с.1092_1143 del – 52
- с.1138_1141del – 4.

В 17 образцах крови доноров мутации гена *CALR* не обнаружены ни одним из методов, включенных в исследование. Таким образом, метод анализа КП выявил мутации гена *CALR* у 25,5 % (97/379) пациентов с ЭТ и ПМФ, что выше по сравнению с секвенированием по Сэнгеру — 23 % (87/379; $p = 0,0008$) и двумя методами ПЦР — 22,1 % (84/379; $p = 0,0002$).

По результатам исследования КП является более чувствительным методом по сравнению с секвенированием по Сэнгеру ($p = 0,0008$), ПЦР-РВ ($p = 0,0002$) и ПЦР с электрофорезом ($p = 0,0002$).

Обсуждение

Наша работа представляет оценку молекулярно-генетических методов выявления мутаций в гене *CALR* для использования в диагностике. Наряду с секвенированием по Сэнгеру проводили анализ КП, оценивали ПЦР-РВ, ПЦР с электрофорезом. Однако сопоставление результатов анализа молекулярно-генетических методов показало, что у каждого из них есть достоинства и недостатки. Предел чувствительности метода секвенирования по Сэнгеру — 10–25 %, ПЦР-РВ и ПЦР с электрофоретической детекцией — 5–10 %, в то время как метод анализа КП имеет предел чувствительности до 5 % [9, 10]. Помимо этого, аллель-специфическая ПЦР-РВ позволяет определить лишь те мутации, на которые непосредственно отжигается праймер. Аллель-специфическая ПЦР с последующей электрофоретической детекцией позволяет определить мутации всего гена, но при низкой аллельной нагрузке повышается вероятность ложноотрицательных результатов. Секвенирование по Сэнгеру является достаточно точным методом, но дорогостоящим и требует много времени на подготовку, не говоря уже о последующем трудоемком аналитическом этапе.

В данном исследовании ПЦР-РВ выявила пациентов с мутациями 1-го и 2-го типа 9-го экзона гена *CALR*, что коррелировало с результатами ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации, а также с результатами методов прямого секвенирования и КП. Тем не менее 10 образцов, определенные методом КП как отличные от нормы, были идентифицированы другими методами, представленными в этой работе, как отрицательные,

вероятно, из-за низкой аллельной нагрузки мутации в этих образцах.

Анализ КП имеет ряд преимуществ перед существующими аналогами, прежде всего выражающихся в высокой чувствительности/специфичности (до 100 %) и возможности совмещения ПЦР с самим этапом детекции мутаций. Принцип метода основан на дифференциации образцов ДНК, несущих потенциальные мутации, по форме или сдвигу КП [11]. Благодаря чувствительности, низкой стоимости и скорости анализ КП широко представлен в клинической лабораторной диагностике. Протокол анализа КП может быть завершен в течение нескольких часов после выделения ДНК из полученного биологического материала. Более распространенные типы мутаций можно идентифицировать без дополнительных исследований, поскольку любой дефект гена (точечная мутация, делеция, инсерция) имеет свой индивидуальный вид КП. Однако при определении образцов, непохожих на известные КП, необходимо проводить следующий этап исследования по уточнению этого дефекта. При этом образцы, показавшие нормальный результат по анализу КП, могут не исследоваться дальше, так как либо не имеют мутаций вообще, либо доля клеток с изменениями настолько мала, что не может быть детектирована.

Наши результаты показывают, что в обычной лабораторной практике метод анализа КП способен обнаруживать мутации *CALR* при достаточно низкой аллельной нагрузке и может быть использован в качестве 1-й линии скрининга. В случае выявления положительного результата методом анализа КП можно либо дополнительно выполнить ПЦР-РВ для мониторинга конкретных типов мутаций (1-го и 2-го), либо провести секвенирование по Сэнгеру в случае обнаружения нетипичной мутации.

Заключение

Сравнение молекулярно-генетических методов, представленных в данной работе, показало, что технология анализа КП с высокой степенью разрешения является простым и высокочувствительным методом скрининга мутаций в гене *CALR*, который можно использовать в клинической диагностике.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2009;2(3):211–21. [Misyurin A.V. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative diseases. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2009;2(3):211–21. (In Russ.).]
2. Chi J., Pierides Ch., Mitsidou A. et al. A sensitive detection method for MPLW515L or MPLW515K mutation in myeloproliferative disorders. Euro J Exp Bio 2014;4(5):33–6.
3. Tutaeva V., Misurin A.V., Michiels J.J. et al. Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycythemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. Hematology 2007;12(6):473–9. DOI: 10.1080/10245330701384005.

4. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–89. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347.
5. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542.
6. Michalak M., Corbett E.F., Mesa N. et al. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 1999;2:281–92.
7. Zapun A., Darby N.J., Tessier D.C. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* 1998;273(11):6009–12. DOI: 10.1074/jbc.273.11.6009.
8. Ning L., Qui-Mei Y., Gale R.P. et al. Frequency and allele burden of CALR mutations in Chinese with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis without JAK2(V617F) or MPL mutations. *Leuk Res* 2015;39(5):510–4.
9. Jones A.V., Ward D., Lyon M. et al. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* 2015;39(1):82–7. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.11.019. Available at: [https://www.lrrjournal.com/article/S0145-2126\(14\)00371-3/abstract](https://www.lrrjournal.com/article/S0145-2126(14)00371-3/abstract).
10. Luo W., Zhongxin Yu.Z. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Investig* 2015;2:16. DOI: 10.3978/j.issn.2306-9759.2015.08.01. Available at: <http://sci.amegroups.com/article/view/7264/8051>.
11. Reed G.H., Kent J.O., Witter C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007;8(6):597–608. DOI: 10.2217/14622416.8.6.597.

Вклад авторов

Л.А. Кесаева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 А.Ю. Буланов, Е.Н. Мисюрина, Н.Н. Касаткина: обзор публикаций по теме статьи;
 Ю.П. Финашутин: оптимизация условий реакций;
 В.В. Тихонова, Н.А. Лыжко, А.А. Турба, А.А. Солодовник: анализ полученных данных;
 О.Н. Солопова: получение данных для анализа;
 В.А. Мисюрин: статистическая обработка и обобщение результатов;
 И.Н. Солдатова: ведение первичной обработки биологического материала пациентов;
 А.В. Мисюрин: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

L.A. Kesaeva: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;
 A.Yu. Bulanov, E.N. Misyurina, N.N. Kasatkina: reviewing of publications of the article's theme;
 Yu.P. Finashutina: optimization of reaction conditions;
 V.V. Tikhonova, N.A. Lyzhko, A.A. Turba, A.A. Solodovnik: analysis of the obtained data;
 O.N. Solopova: obtaining data for analysis;
 V.A. Misyurin: statistical analysis and summation of the results;
 I.N. Soldatova: primary preparation of patients' biological material;
 A.V. Misyurin: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>
 Ю.П. Финашутин/Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-536X>
 В.В. Тихонова/V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
 О.Н. Солопова/O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>
 Н.Н. Касаткина/N.N. Kasatkina: <https://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
 Н.А. Лыжко/N.A. Lyzhko: <https://orcid.org/0000-0003-3834-5816>
 В.А. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
 А.А. Солодовник/A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
 А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 25.04.2019. **Принята к публикации:** 30.05.2019.

Article received: 25.04.2019. **Accepted for publication:** 30.05.2019.

Прогностическая значимость экспрессии гена *BRCA1* у больных раком молочной железы

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5

Контакты: Матвей Михайлович Цыганов TsyganovMM@yandex.ru

Введение. В настоящее время при выборе тактики лечения особое положение стал занимать *BRCA*-ассоциированный рак молочной железы, хотя изначально лекарственное лечение таких пациентов немногим отличалось от терапии спорадического заболевания. Хорошо известно, что наличие в опухолевых клетках такого явления, как дефицит гомологичной рекомбинации, обусловленный в основном дефектом генов *BRCA1/2*, связано с эффективностью лечения. В настоящее время активно изучается влияние снижения функциональной активности *BRCA1* на чувствительность опухоли к ДНК-повреждающим агентам и на прогноз заболевания.

Цель исследования — оценка связи экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с прогнозом заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 111 больных раком молочной железы T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB стадии) с морфологически верифицированным диагнозом. Оценена начальная и послеоперационная экспрессия гена *BRCA1* в опухолевом материале. Из опухолевого материала до неoadъювантной химиотерапии и после нее выделяли РНК. Уровень экспрессии *BRCA1* оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

Результаты. Были оценены отдаленные результаты лечения пациентов в зависимости от уровня экспрессии гена *BRCA1*. Установлено, что наличие гипоэкспрессии *BRCA1* (уровень менее 1) в опухолевой ткани после неoadъювантной химиотерапии является благоприятным прогностическим фактором и сопряжено с высокими показателями безметастатической выживаемости ($p = 0,0002$). Кроме этого, аналогичный результат показан для пациентов, пролеченных по схеме неoadъювантной химиотерапии FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан) ($p = 0,005$). Несмотря на отсутствие статистически значимых различий, у 8 больных, пролеченных химиотерапией с включением препаратов платины, наблюдался низкий уровень экспрессии *BRCA1* в резидуальной опухоли и зарегистрирована 100 % безметастатическая и общая выживаемость.

Заключение. На основании полученных данных можно полагать, что aberrантное состояние гена *BRCA1* (низкая экспрессия) в опухоли молочной железы может являться перспективным потенциальным маркером прогноза заболевания.

Ключевые слова: рак молочной железы, ген *BRCA1*, экспрессия, безметастатическая выживаемость, прогноз, дефицит гомологичной рекомбинации

Для цитирования: Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Певзнер А.М. и др. Прогностическая значимость экспрессии гена *BRCA1* у больных раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(2):55–60.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-2-55-60

The prognostic significance of *BRCA1* gene expression in patients with breast cancer

M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, A.M. Pevzner, E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya, N.V. Litviakov

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;

5 Kooperativny Pereulok, Tomsk 634009, Russia

Background. Nowadays, *BRCA*-associated breast cancer occupies a special position in the choice of treatment strategy. Although, the drug treatment of such patients was almost the same as the treatment of sporadic disease. Of particular interest is the assessment of the deficit of homologous recombination, which may include various dysfunctions of the *BRCA1* gene. Moreover, it has been shown that a decrease in the functional activity of *BRCA1* is reflected in the sensitivity of the tumor to DNA damaging agents, and the prognosis of the disease becomes more favorable.

Objective: assessment of the association of *BRCA1* gene expression in a breast tumor with the prognosis of the disease.

Materials and methods. The study included 111 patients with breast cancer T1–4N0–3M0 (stage IIA–IIIB), with a morphologically verified diagnosis. Initial and postoperative expression of *BRCA1* in tumor material was evaluated. RNA was isolated from the tumor material before treatment and after neoadjuvant chemotherapy. The level of *BRCA1* expression was assessed using reverse transcriptase quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results. As a result of the study, long-term results of treatment of patients were evaluated depending on the level of *BRCA1* gene expression. The presence of *BRCA1* hypoeexpression (level less than 1) in tumor tissue after neoadjuvant chemotherapy was found to be a favorable prognostic factor and is associated with high rates of metastasis-free survival ($p = 0.0002$). In addition, a similar result is shown for patients treated with the FAC (fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide) neoadjuvant chemotherapy regimen ($p = 0.005$). Despite the absence of statistically significant differences, in 8 patients who underwent chemotherapy with the inclusion of platinum drugs, there was a low level of *BRCA1* expression in a residual tumor and 100 % non-metastatic and overall survival.

Conclusion. Based on the data obtained, it can be assumed that the aberrant state of the *BRCA1* gene (low expression) in a breast tumor may also be a promising marker for the prognosis of the disease, which confirms the undoubted relevance of the study, but also requires further detailed study.

Key words: breast cancer, *BRCA1*, expression, non-metastatic survival, forecast, lack of homologous recombination

For citation: Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Pevzner A.M. et al. The prognostic significance of *BRCA1* gene expression in patients with breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(2):55–60.

Введение

В настоящее время определение наличия герминальных мутаций гена *BRCA1* у больных раком молочной железы (РМЖ) и раком яичников является неотъемлемой частью выбора тактики лечения. При этом полученная информация позволяет обеспечить своевременные мероприятия по диагностике и профилактике заболевания. Кроме этого, установлено, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ в отличие от спорадической формы заболевания показывает высокую чувствительность к препаратам платины и *PARP*-ингибиторам, что делает возможным индивидуализацию выбора лекарственной терапии на основе молекулярно-генетических характеристик опухоли [1].

Важно отметить, что наличие герминальных мутаций определяет не только схему химиотерапевтического лечения, но и прогноз заболевания. Так, мета-анализ 2015 г. показал, что больные раком яичника с мутацией *BRCA1* имели более высокие показатели общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости по сравнению с таковыми в контрольной группе, тогда как при РМЖ был продемонстрирован обратный результат: носительство мутации ассоциировалось с худшим прогнозом заболевания [2]. В одном из последних исследований также было показано, что возникновение реверсивных мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* в опухоли после неoadъювантной химиотерапии (НХТ) у пациентов с РМЖ сопряжено с плохим ответом на химиотерапию, развитием ранних рецидивов и смертью [3]. Большой интерес представляет оценка дефицита гомологичной рекомбинации, который может включать различные дисфункции гена *BRCA1*, такие как снижение экспрессии, развитие аллельного дисбаланса, делеция данного гена, потеря гетерозиготности, генетическая нестабильность опухоли и т.д. [4]. В результате дефицита гомологичной рекомбинации опухоль становится чрезвычайно чувствительной к ДНК-повреждающим агентам, а прогноз заболевания становится более благоприятным [5]. Таким образом, определение дисфункции гена *BRCA1* в опухоли молочной железы может быть использовано в качестве потенциального биомаркера чувствительности химиотерапии и прогноза заболевания.

Цель исследования — оценка связи экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с прогнозом заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 111 больных РМЖ T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB стадии) с морфологически

верифицированным диагнозом в возрасте 25–68 лет (средний возраст $48,0 \pm 0,87$ года), получавшие лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2006 по 2018 г. (табл. 1). В соответствии с Consensus Conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast (26–28 апреля 2003 г., Филадельфия, Пенсильвания) [6] все больные получали 2–8 курсов НХТ по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, капецитабин), СР (циклофосфан, цисплатин) и монотерапию доцетакселом. Через 3–5 нед после НХТ больным выполняли операцию, затем — 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешением локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 1 от 14 января 2013 г.). Все пациенты подписали информированное согласие.

В качестве исследуемого материала использовали биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под ультразвуковым контролем, а также операционный материал (~60–70 мм³) после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) и сохраняли при температуре –80 °C (после 24-часовой инкубации при температуре +4 °C) для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК. Тотальная РНК была выделена из 111 парных образцов опухоли до лечения и после НХТ с использованием набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия), с добавлением в раствор РНК ингибитора РНКазы Ribolock (Fermentas, Литва). Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) (125–210 нг/мкл; A260/A280 = 1,85–1,95; A260/A230 = 1,80–2,00). RIN (RNA Integrity Number) составил 7,6–8,0. Для получения комплементарной ДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Scientific, США) со случайными гексануклеотидами.

Количественная полимеразная цепная реакция. Уровень экспрессии гена *BRCA1* (PubMed NM_007294.3) оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan (прямой праймер 5'-ACAGCTGTGTGGTGCTTCTGTG-3'; обратный

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры обследованных больных раком молочной железы**Table 1.** Clinical and morphological parameters examined breast cancer patients

Параметр Parameter	n (%)
Возраст, лет: Age, years:	
≤45	38 (34,2)
>45	73 (65,8)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	14 (12,6)
T2	82 (73,9)
T3	7 (6,3)
T4	8 (7,2)
Лимфогенное метастазирование: Lymphogenous metastasis:	
N0	44 (39,6)
N1	47 (42,3)
N2	10 (9,0)
N3	10 (9,0)
Молекулярный подтип: Molecular subtype:	
люминальный В luminal B	78 (70,3)
трижды негативный triple negative	12 (10,8)
HER2-положительный HER2-positive	21 (18,9)
Схема неoadъювантной химиотерапии: Neoadjuvant chemotherapy scheme:	
СAX	28 (25,2)
FAC	45 (40,9)
доцетаксел docetaxel	30 (27,0)
СР	8 (7,2)
Ответ на неoadъювантную химиотерапию: Response to neoadjuvant chemotherapy:	
прогрессирование progression	12 (10,8)
стабилизация stabilization	34 (30,6)
частичная регрессия partial regression	57 (51,4)
полная регрессия full regression	8 (7,2)

Примечание. СAX — циклофосфан, доксорубин, капецитабин; FAC — фторурацил, доксорубин, циклофосфан; СР — циклофосфан, цисплатин.

Note. СAX — cyclophosphamide, doxorubicin, capecitabine; FAC — fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide; СР — cyclophosphamide, cisplatin

праймер 5'-CATTGTCCTCTGTCCAGGCATC-3'; зонд FAM-5'-CATCATTCACCCCTTGGCACAGGTGT-3' — BHQ1; ампликон 107 bp) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (CorbettResearch, Австралия). Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI. Проверка последовательности ампликона в базе

Primer-BLAST показала, что используемые праймеры отжигаются на всех представленных изоформах гена *BRCA1*.

Полимеразную цепную реакцию ставили в 3 репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Трис-НCl, pH 8,8 при 25 °C, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед. HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл: 94 °C, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов: 1-й шаг — 94 °C 10 с и 2-й шаг — 60 °C 20 с.

В качестве генов-рефери использовали *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta). Уровень экспрессии гена *BRCA1* нормализовали по отношению к экспрессии генов-рефери и измеряли в условных единицах. Относительную экспрессию оценивали с помощью метода Pfaffl [7]. В качестве калибратора использовали РНК от 20 пациентов, выделенную из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НХТ. Уровень экспрессии в нормальной ткани принимали за единицу.

Статистические методы. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., США). Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью принятых методов параметрической и непараметрической статистики. Определение нормальности распределения осуществляли по критерию Шапиро—Уилка. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона—Манна—Уитни. Вычисляли средние показатели и стандартные ошибки относительных величин. Сравнение частот по качественным данным анализировали с помощью двустороннего критерия Фишера. Для ОВ и безметастатической выживаемости (БМВ) использовали кривые выживаемости, построенные по методу Каплана—Майера.

Результаты

В общей группе из 111 обследованных пациентов отдаленные метастазы развились у 38 (34 %) больных в сроки 4—122 мес от момента постановки диагноза. Однолетняя БМВ составила 97,2 %, 2-летняя — 82,6 %, 5-летняя — 68,8 %.

Сравнение показателей экспрессии гена *BRCA1* в опухоли до лечения и после НХТ у больных с наличием гематогенных метастазов по сравнению с группой пациентов без метастазов показало статистически значимые различия в послеоперационном уровне экспрессии данного гена (табл. 2).

Для выявления связи показателей экспрессии *BRCA1* с выживаемостью мы воспользовались статистическими характеристиками нашей выборки по уровню экспрессии *BRCA1*. В результате были получены

Таблица 2. Уровень экспрессии *BRCA1* в опухоли до неoadъювантной химиотерапии и после нее в зависимости от наличия гематогенных метастазов

Table 2. The level of *BRCA1* expression in the tumor before and after neoadjuvant chemotherapy, depending on the availability of hematogenous metastases

Экспрессия Expression	Наличие гематогенных метастазов и рецидивов (<i>n</i> = 38) Availability hematogenous metastases and relapses (<i>n</i> = 38)	Отсутствие гематогенных метастазов и рецидивов (<i>n</i> = 73) Absence hematogenous metastases and relapses (<i>n</i> = 73)	<i>p</i>
<i>BRCA1</i> до лечения <i>BRCA1</i> before treatment	0,863 ± 0,136	0,980 ± 0,13	0,875
<i>BRCA1</i> после лечения <i>BRCA1</i> after treatment	1,181 ± 0,213	0,512 ± 0,061	0,011

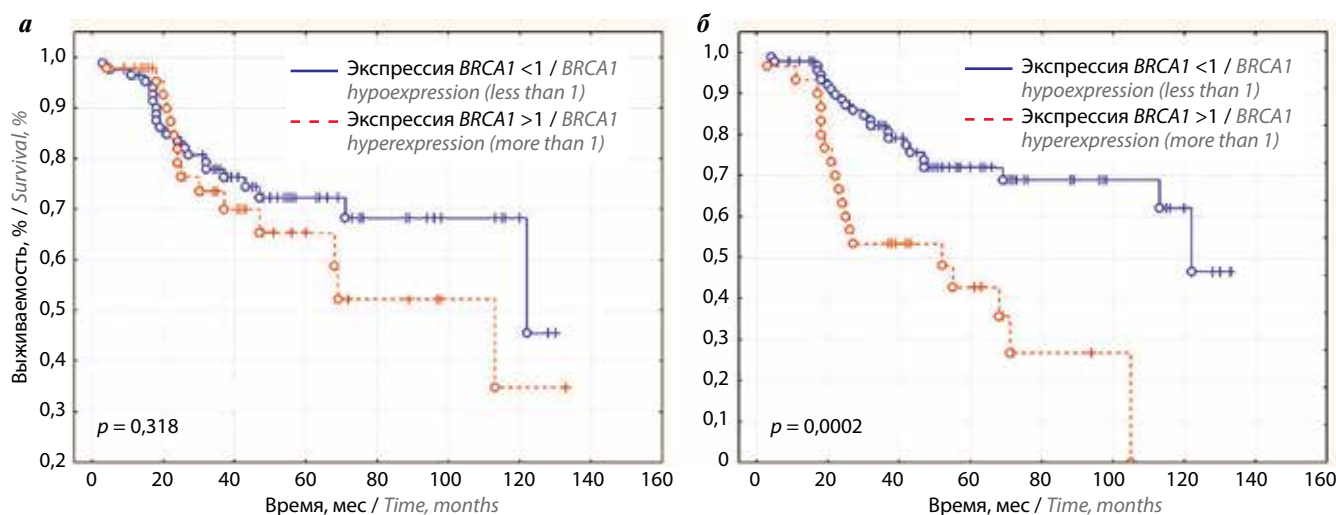


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли до неoadъювантной химиотерапии (а) и после нее (б)

Fig. 1. Metastasis-free survival of patients with breast cancer, depending on the expression level of the *BRCA1* gene in the tumor before (a) and after neoadjuvant chemotherapy (б)

2 группы анализа: пациенты с гиперэкспрессией гена *BRCA1* (экспрессия >1) и пациенты с гипоекспрессией (экспрессия <1). Анализ сравнения частот больных с гипер- и гипоекспрессией в зависимости от основных клинко-морфологических параметров не показал статистически значимых различий. Далее с использованием метода Каплана–Майера было продемонстрировано, что при гипоекспрессии *BRCA1* в опухоли молочной железы после НХТ показатель БМВ статистически значимо выше (*log-rank*-тест $p = 0,0002$) по сравнению с таковым у пациентов, у которых наблюдался уровень экспрессии >1 (рис. 1).

Статистически значимых различий в показателях ОБ у пациентов с гипер- и гипоекспрессией гена *BRCA1* как до лечения, так и после НХТ не установлено (*log-rank*-тест $p = 0,131$ и $p = 0,816$ соответственно).

Следующим этапом работы явился анализ показателей ОБ и БМВ в зависимости от уровня экспрессии исследуемого гена и схемы НХТ. С начальным уровнем экспрессии *BRCA1* статистически значимых различий в показателях ОБ и БМВ не установлено. Однако было показано аналогично предыдущему результату, что наличие гиперэкспрессии в опухоли молочной

железы после НХТ сопряжено с низкими показателями БМВ у пациентов, пролеченных по схеме FAC (*log-rank*-тест $p = 0,005$) и САХ (на уровне выраженной тенденции; $p = 0,08$) (рис. 2).

Показатель 5-летней БМВ у группы пациентов, получавших схему НХТ FAC (2–8 курсов), с уровнем экспрессии *BRCA1* менее 1, составил 67 % против 34 % у пациентов с гиперэкспрессией исследуемого гена.

Наши результаты не показали статистически достоверной связи уровня экспрессии гена *BRCA1* с показателями ОБ и БМВ у пациентов, получавших доцетаксел (*log-rank*-тест $p = 0,226$ и $p = 0,805$ соответственно).

Интересный результат был отмечен для пациентов, получавших НХТ с включением препаратов платины. Помимо того, что у 7 из 8 больных наблюдался объективный ответ на НХТ (полная и частичная регрессия), все пациенты имели 100 % 2-летнюю БМВ и ОБ. Из-за эффекта малых выборок данный результат не является статистически достоверным. Тем не менее полученные данные свидетельствуют в пользу перспективности дальнейших исследований в этом направлении и валидации прогностической значимости на большей выборке больных.

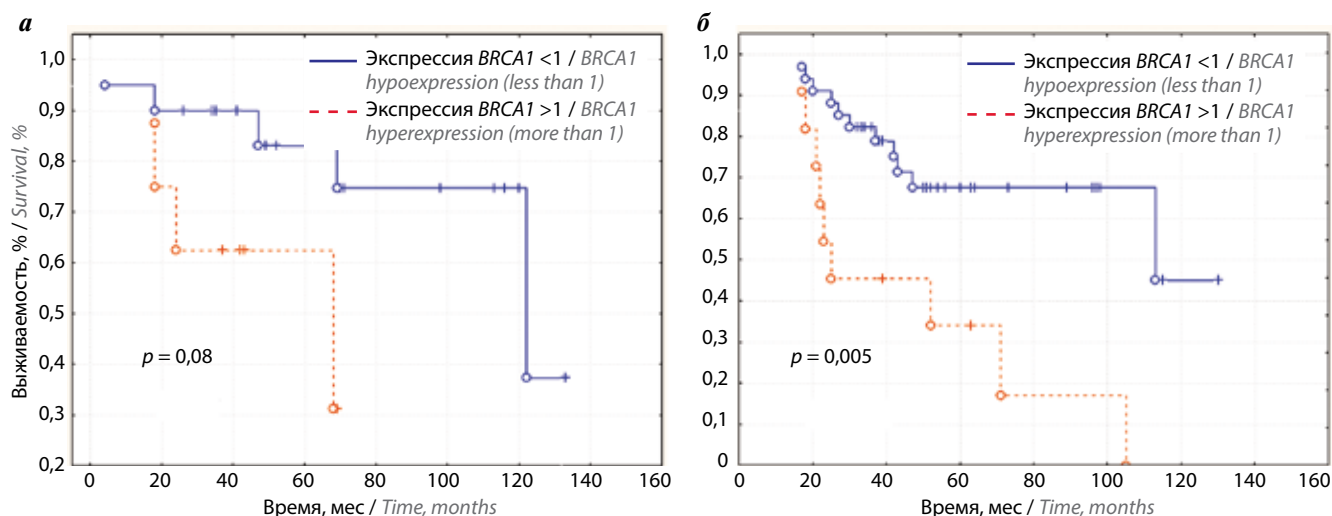


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от уровня экспрессии *BRCA1* в резидуальной опухоли, пролеченных по схемам CAX (а) и FAC (б). CAX — циклофосфан, доксорубин, капецитабин; FAC — фторурацил, доксорубин, циклофосфан
Fig. 2. Metastasis-free survival of patients with breast cancer depending on the level of *BRCA1* expression in a residual tumor treated according to the CAX (a) and FAC (b) schemes. CAX — cyclophosphamide, doxorubicin, capecitabine; FAC — fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide

Обсуждение

В недавнем исследовании на нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта была показана связь экспрессии *BRCA1* с прогнозом заболевания [8]. Авторами было установлено, что низкая экспрессия *BRCA1* (менее 2) сопряжена с более высокими показателями безрецидивной выживаемости ($p < 0,05$) по сравнению с группой больных, у которых экспрессия была выше 2.

Поскольку *BRCA*-ассоциированные опухоли развиваются за счет различных механизмов, в том числе повреждений, связанных с системой репарации, двухцепочечных разрывов и сшивок ДНК, то противоопухолевые препараты, вызывающие подобные повреждения (в частности, препараты платины), могут оказаться высокоэффективными, а следовательно, влиять на отдаленные результаты лечения. Положительный эффект такого лечения был показан в основном для наследственного РМЖ и рака яичников [9]. Некоторые авторы указывают, что отсутствие экспрессии *BRCA1* является независимым предиктором низких показателей безрецидивной выживаемости у пациентов, получавших химиотерапию на основе таксанов [10].

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. В исследовании 2018 г. было установлено, что при раке яичников низкая экспрессия *BRCA1* является благоприятным прогностическим фактором для ОВ пациентов ($p = 0,028$) [11], при РМЖ низкая экспрессия белка *BRCA1* также коррелирует с благоприятным исходом заболевания [12].

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что гиперэкспрессия гена *BRCA1* в опухолевой ткани молочной железы после НХТ является неблагоприятным прогностическим фактором и может быть использована в качестве маркера прогноза заболевания. У 7 (из 8 взятых в анализ) пациентов с дефицитом *BRCA1* наблюдались наибольшие показатели БМВ среди группы пациентов, получавших в неoadъювантном режиме химиотерапию по схемам FAC и CP. Это свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения возможности использования выявления дефицита *BRCA1* в качестве маркера чувствительности к химиотерапии и прогноза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии. Вопросы онкологии 2012;58:153–63. [Imyanitov E.N. Molecular diagnostics in oncology. Voprosy onkologii = Oncology Issues 2012;58: 153–63. (In Russ.)].
- Zhong Q., Peng H.L., Zhao X. et al. Effects of *BRCA1*- and *BRCA2*-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. Clin Cancer Res 2015;21:211–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1816.
- Afghahi A., Timms K.M., Vinayak S. et al. Tumor *BRCA1* reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance. Clin Cancer Res 2017;1:1–26. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2174.
- Gerratana L., Fanotto V., Pelizzari G. et al. Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? Cancer Treat Rev 2016;48:34–41. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.06.004.
- Mccabe N., Turner N.C., Lord C.J. et al. Deficiency in the repair of DNA damage

- by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66(16):8109–15.
DOI: 10.1158/0008-5472.
CAN-06-0140.
6. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania. *Breast J* 2004;10:273–94.
DOI: 10.1111/j.1075-122X.2004.21594.x.
7. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 2001;29:45.
DOI: 1093/nar/29.9.e45.
8. Гафтон И.Г., Имянитов Е.Н., Семиглазов В.В. и др. Экспрессия гена *BRCA1* при нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта. *Сибирский онкологический журнал* 2014;16:11–5. [Gafton I.G., Imyanitov E.N., Semiglasov V.V. et al. *BRCA1* gene expression in endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology* 2014;16:11–5. (In Russ.)].
9. Imyanitov E.N., Moiseyenko V.M. Drug therapy for hereditary cancers. *Hereditary Cancer Clin Pract* 2011;9:1–16.
DOI: 10.1186/1897-4287-9-5.
10. Kurebayashi J., Yamamoto Y., Kurosumi M. et al. Loss of *BRCA1* expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes. *Anticancer Res* 2006;26(1B):695–701.
11. Tsibulak I., Shivalingaiah G., Wenzel S. et al. Clinical impact of *BRCA1* and *BRCA2* mRNA expression in ovarian cancer. *Am Society Clin Oncol* 2018;36:e17533.
DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e17533.
12. Nomura H., Kataoka F., Aoki D. et al. Expression of potential biomarkers associated with homologous recombination repair in patients with ovarian or triple-negative breast cancer. *Cancer Biomark* 2016;16(1):145–52.
DOI: 10.3233/CBM-150550.

Вклад авторов

М.М. Цыганов: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;
М.К. Ибрагимова: анализ полученных данных;
А.М. Певзнер: обзор публикаций по теме статьи;
Е.Ю. Гарбуков, Е.М. Слонимская: получение данных для анализа;
Н.В. Литвяков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

M.M. Tsyganov: developing the research design, article writing;
M.K. Ibragimova: analysis of the obtained data;
A.M. Pevzner: reviewing of publications of the article's theme;
E.Yu. Garbukov, E.M. Slonimskaya: obtaining data for analysis;
N.V. Litviakov: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.М. Цыганов/M.M. Tsyganov: <https://orcid.org/0000-0001-7419-4512>
М.К. Ибрагимова/M.K. Ibragimova: <https://orcid.org/0000-0001-8815-2786>
А.М. Певзнер/A.M. Pevzner: <https://orcid.org/0000-0002-9657-9058>
Е.Ю. Гарбуков/E.Yu. Garbukov: <https://orcid.org/0000-0002-2917-8158>
Е.М. Слонимская/E.M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>
Н.В. Литвяков/N.V. Litviakov: <https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 18-29-09131 мк «Феномен «замирания» опухоли в процессе химиотерапии».

Financing. This work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research 18-29-09131 mk «Phenomenon of tumor fading in the process of chemotherapy».

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 24.04.2019. **Принята к публикации:** 19.06.2019.

Article received: 24.04.2019. **Accepted for publication:** 19.06.2019.